

BEST AVAILABLE COPY

EP

99/04360

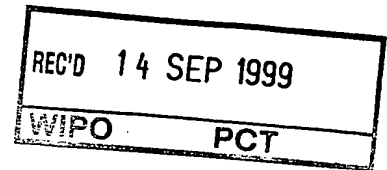
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 99/4360

09/720380

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Bescheinigung

5

Herr Hassan J o m a a in Gießen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter
der Bezeichnung

"Mittel zur Hemmung des 1-Deoxy-D-xylose-5-phosphat-Pathways
zur Therapie von Infektionskrankheiten"

am 22. September 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüngli-
chen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 23. Juli 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Seiler

Aktenzeichen: 198 43 279.8



11.05.08.99

Hassan Jomaa, Gießen

15362

Mittel zur Hemmung des 1-Deoxy-D-xylose-5-phosphat-Pathways
zur Therapie von Infektionskrankheiten

Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Therapie von parasitären Erkrankungen verursacht durch ein- oder mehrzellige Parasiten. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Weiter betrifft die Erfindung Proteine, sowie Teilstücke von Proteinen, ferner DNA-Sequenzen, die für diese Proteine bzw. für Teilstücke dieser Proteine kodieren, sowie die Verwendung dieser DNA-Sequenzen, dieser Proteine oder ihrer Teilstücke zur Identifizierung von Stoffen mit Wirkung gegen ein- oder mehrzellige Parasiten.

Der Begriff Parasiten beinhaltet einzellige Parasiten, Protozoen, und mehrzellige Parasiten einschließlich Helminthen und Anthropoden. Diese verursachen Infektionserkrankungen bei Mensch und Tier..

Es existiert bereits eine Vielzahl von Mitteln gegen parasitäre Erkrankungen. Die vorhandenen Mittel werden durch die sich rasch entwickelnden Resistenzen gegen diese Mittel bereits unbrauchbar für die Therapie von Mensch und Tier. So sind bereits viele Regionen von Malaria Parasiten befallen, die gegen Standard-Medikamente wie Chloroquin resistent sind. Auch sind Berichte über Resistenz-Entwicklung

11.05.08.99

gegen Standard-Mittel (Praziquantel) zur Behandlung der Bilharziose bekannt. Diese Resistenzentwicklungen und andere Faktoren haben dazu geführt, daß Malaria und Bilhaziose bereits zu den häufigsten Erkrankungen in den Tropen gezählt werden. Geschätzte 300-500 Millionen Menschen sind an Malaria erkrankt. 2-2.5 Millionen Menschen sterben im Jahr an Malaria. Weiter sind neue Medikamente wie Mefloquin sehr teuer in der Herstellung und sehr nebenwirkungsreich. Es besteht ein großer Bedarf an Arzneimittel zur Therapie von Mensch und Tier.

Es gab in der Vergangenheit viele Ansätze zur Entwicklung von Chemotherapeutika gegen Parasiten, insbesondere gegen Krankheitserreger der Malaria und der Bilharziose. Einer dieser Ansätze befaßt sich mit der Inhibition der sogenannten Isoprenoidbiosynthese. Isoprenoide sind Moleküle, die aus einzelnen Isopreneinheiten (Isopentenyl-Diphosphat) gebildet werden, und wichtige Funktionen in der Zelle übernehmen. Hierzu gehören Sterole, Ubichinone und andere Moleküle, die für den Haushalt der Parasiten wichtig sind. Die Vorgehensweise basierte hierbei auf einem Modell, bei dem in Pilze und in Säugerzellen etabliert wurde. In Pilzen und in Säugerzellen entsteht die Untereinheit Isopentenyl-diphosphat auf der Basis der Kondensation von drei Molekülen Acetyl-CoA zu HMG-CoA. HMG-CoA wird dann von der HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonat umgewandelt, welches dann zu Isopentenyl-diphosphat umgewandelt wird mit Mevalonat-Phosphat als Zwischenstufe. Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase wie zum Beispiel Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin wurden zur Inhibition des Wachstums der Parasiten verwendet. Bei Malaria gelang es zwar, unter Anwendung sehr hoher Dosen Lovastatin und Simvastatin eine in vitro Inhibition zu erreichen, jedoch mißlang die Inhibition in vivo.

11.05.08.99

Die Behandlung Schistosoma-infizierter Mäuse mit Lovastatin führte zu einer Inhibition der Eiablage dieser Würmer, jedoch mußten sehr hohe Konzentrationen an Lovastatin aufgewendet werden, um einen Teil der Würmer in vivo zu töten.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß Parasiten, insbesondere Plasmodien und Trypanosomen (Verursacher der Malaria und der Schlafkrankheit) zumindest einen weiteren Stoffwechselweg zur Synthese von Isoprenoiden besitzen. Dieser Stoffwechselweg beruht auf einer Kondensation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP). DOXP wird dann umgewandelt zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, das dann zu Isopentenylidiphosphat umgewandelt wird mit 2-C-Methyl-erythrose-4-phosphat als Zwischenstufe. Dieser Stoffwechselweg besteht unter anderem aus den Enzymen DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase (Siehe Figur 7). Dieser Stoffwechselweg war bisher nur in Pflanzen, in Algen und in einigen Bakterien beschrieben worden (Sprenger et al. PNAS, 94 (1997) 12857-62 und Kuzuyama et al. Tetrahedron Letters 39 (1998) 4509-12).

Die Inhibition des oben beschriebenen DOXP-Stoffwechselwegs, insbesondere der Enzyme DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase durch die dem Fachmann bekannten Techniken eignet sich zur Vorbeugung und Behandlung von Infektionen, verursacht durch ein- und mehrzellige Parasiten bei Mensch und Tier. Da dieser Stoffwechselweg nicht im Menschen vorhanden ist, eignet er sich hervorragend als Ziel für eine gezielte Chemotherapie von Parasiten. Insbesondere eignen sich die Enzyme Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthetase und Deoxyxylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase als Ziel für eine Chemotherapie. Besonders nebenwirkungsarm und geeignet

11.05.08.99

zeigte sich die Inhibition des Enzyms Deoxyxylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase von Malaria, da der Mensch weder über Substrate und deren Vorstufen noch über Produkt des Enzyms noch über das Enzym selbst verfügt.

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und neue Mittel, die den DOXP-Stoffwechselweg hemmen und deren Anwendung zur Therapie von Infektionskrankheiten verursacht durch ein- oder mehrzellige Parasiten.

Die Erfindung hat das Ziel, ein neues Mittel zur Therapie von parasitären Erkrankungen bei Mensch und Tier bereitzustellen. Ihr liegt die Aufgabe zur Grunde, ein Medikament zu entwickeln, das selektiv den Erreger abtötet und nebenwirkungsarm ist.

Diese Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert. Die Erfindungsverfahren und Erfindungsmittel sind dadurch gekennzeichnet, daß sie

- die Isoprenoidbiosynthese im sogenannten 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg hemmen.

Alle beschriebenen Stoffwechselwege sind nicht in Mensch und Tier vorhanden, sondern nur in Pflanzen, Algen, manchen Eubakterien und in Parasiten wie zum Beispiel Malaria-Parasiten, daher zeichnet sich diese Therapie-Strategie als sehr nebenwirkungsarm aus.

Die vorliegende Erfindung betrifft Enzyme die an diesem Stoffwechselweg beteiligt sind, sowie Teilstücke dieser Enzyme. Die vorliegende Erfindung betrifft weiter DNA-

11.05.88.99

Sequenzen, die für diese Enzyme kodieren, bzw. für Teilstücke dieser Enzyme.

Die Erfindung betrifft weiter die Verwendung dieser Enzyme oder ihrer Teilstücke, oder die Verwendung der DNA-Sequenzen, die für diese Enzyme kodieren, bzw. für Teilstücke dieser Enzyme zur Identifizierung von Stoffen mit Wirkung gegen ein- oder mehrzellige Erreger.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Identifizierung der Enzyme oder ihrer Teilstücke sowie die Herstellung der Enzyme oder ihrer Teilstücke über rekombinante Technologie.

Im folgenden wird die Erfindung anhand der beiliegenden Zeichnungen genauer beschrieben.

Es zeigen:

Fig. 1a die Nukleotid-Sequenz des Gens, das für die Proteins 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase aus Plasmodium falciparum codiert,

Fig. 1b die Nukleotid-Sequenz des Gens, das für die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase aus Plasmodium falciparum codiert,

Fig. 2a die Nukleotid-Sequenz des Gens, für die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase aus Plasmodium falciparum codiert und die entsprechende Aminosäure-Sequenz

Fig. 2b die Nukleotid-Sequenz des Gens, für die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase aus Plasmodium falciparum codiert und die entsprechende Aminosäure-Sequenz,

Fig. 3a die Aminosäure-Sequenz des Proteins 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase aus Plasmodium falciparum,

11.05.08.99

Fig. 3b die Aminosäure-Sequenz des Proteins 1-Doxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase aus dem Parasiten Plasmodium falciparum,

Fig. 4a die Darstellung der Homologien zwischen der Aminosäure-Sequenz des Proteins 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase aus Plasmodium falciparum (Pfal) und bekannte Sequenzen aus unterschiedlichen Gen-Datenbanken. Die dargestellten Mikroorganismen sind Heilcobacter pylori (Hpyl), Mycobacterium tuberculosis (Mtb), Bacillus subtilis (Bsub), Pseudomonas aeruginosa (Paer), Haemophilus influenzae (Hinf), Escheichia coli (Ecol), Aquifex aeolicus (Aeo) Synechocystis sp. (Syn),

Fig. 4b die Darstellung der Homologien zwischen der Aminosäure-Sequenz des Proteins 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase aus Plasmodium falciparum (Pfal) und bekannte Sequenzen aus unterschiedlichen Gen-Datenbanken. Die dargestellten Mikroorganismen sind Heilcobacter pylori (Hpyl), Mycobacterium tuberculosis (Mtb), Bacillus subtilis (Bsub), Pseudomonas aeruginosa (Paer), Haemophilus influenzae (Hinf), Escheichia coli (Ecol), Synechocystis sp. (Syn), Mentha piperita (Mpip), Oryza sativa (Osat), Arabidopsis thaliana (Atha), R. capsulata (Rcap)

Fig. 5 In-vivo-Daten für die Parasitämie-Werte nach 4 tägiger Therapie mit jeweils drei Dosen der Stoffe: Formyl, das 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propylphosphonsäure-mononatriumsalz entspricht, und Acetyl, das 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propylphosphonsäure-mononatriumsalz entspricht,

Fig. 6a die Inhibition des Wachstums von P. falciparum nach Zugabe von 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propylphosphonsäure-mononatriumsalz (offene Kreise) und 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propylphosphonsäure-mononatriumsalz (geschlossene Kreise) für den Stamm HB3,

17.05.06.99

Fig. 6b die Inhibition des Wachstums von *P. falciparum* nach Zugabe von 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz (offene Kreise) und 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz (geschlossene Kreise) für den Stamm A2, und Fig. 6a die Inhibition des Wachstums von *P. falciparum* nach Zugabe von 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz (offene Kreise) und 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz (geschlossene Kreise) für den Stamm Dd2, und

Fig. 7 den klassischen Acetat/-Mevalonat-Pathway im Vergleich zum alternativen DOX-P-Pathway.

Mittels genetischer Verfahren konnten wir die kodierenden Gene der Enzyme DOXP-Synthase, und DOXP-Reduktoisomerase nachweisen (Figuren 1a, 1b, 2a, 2b). Nach Anreicherung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion aus dem Genom von *P. falciparum* wurden diese Gene in bakteriellen Plasmiden kloniert und ihre Nukleotidsequenz bestimmt. Die Sequenzdaten zeigten eine hohe Homologie dieser Gene mit den entsprechenden Genen aus Algen, Pflanzen und Bakterien (Figuren 4a und 4b). Die sehr hohen Homologien zeigten eindeutig, daß die drei Gene die Enzyme DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase von *P. falciparum* codieren.

Nach Expression in heterologen Systemen konnten wir die Enzyme als rekombinante Proteine reinigen und für Aktivitätsstudien in zellfreien Systemen einsetzen. Die Aktivität der DOXP-Synthase wurde durch Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat gemessen. Die Aktivität der DOXP-Reduktoisomerase wurde durch Umsetzung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-

11 05 08 99

D-erythritol-4-phosphat in Gegenwart von NADPH gemessen. Die Messung der Veränderung der NADPH-Konzentration ist Parameter. Dieses Verfahren ist dem Fachmann bekannt.

Die Enzyme können über ihre DNA-Sequenz (Figuren 1a, 1b, 2a, 2b) und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (Figuren 3a und 3b) definiert werden. Die Enzyme der einzelnen Parasiten, können sich von Parasiten zu Parasiten unterscheiden. Solche Variationen der Aminosäuren sind in der Regel Aminosäureaustausche. Es kann sich aber auch um Deletionen, Insertionen und Additionen von Aminosäuren zur Gesamtsequenz handeln. Die erfindungsgemäßen Enzyme können - sowohl im Umfang und Art abhängig von der Zelle und Zelltyp, in dem sie exprimiert werden - glycosyliert oder nicht glycosyliert sein.

Die erfindungsgemäßen Enzyme oder Teilstücke dieser Enzyme werden durch Expression der erfindungsgemäßen DNA in geeigneten Expressionssystemen, beispielsweise in Bakterien, insbesondere in E. coli, als prokaryontisches Expressionssystem oder in einem eukaryontischen Expressionssystem, insbesondere COS-Zellen oder Dictyostelium discoideum, hergestellt.

Mit Hilfe der durch die Erfindung bereitgestellte Nukleinsäuresequenz ist es möglich, im Genom von beliebigen Parasiten die kodierenden Genen oder deren Varianten zu suchen, diese zu identifizieren und die gewünschten kodierenden Gene für die Enzyme zu isolieren. Derartige Verfahren und die hierfür geeigneten Screening-Methoden sind dem Fachmann bekannt.

11.05.88.99

Durch die Anwendung der rekombinanten Technologie ist es möglich, eine Vielzahl von Varianten von Enzymen oder Teilstücke von Enzymen herzustellen. Derartige Derivate können beispielsweise in einzelnen oder mehreren Aminosäuren durch Substitution, Deletion oder Addition modifiziert sein. Die Derivatisierung kann beispielsweise über site directed mutagenesis (ortsspezifische Mutagenese) erfolgen. Derartige Variationen sind für einen Fachmann ohne weiteres durchführbar. Es muß lediglich sichergestellt sein, daß die charakteristischen Eigenschaften der Enzyme erhalten bleiben. Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind deshalb die Enzyme, die am DOXP-Stoffwechselweg beteiligt sind, insbesondere DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase, die

- a) das Produkt einer prokaryontischen oder eukaryontischen Expression einer exogenen DNA ist,
- b) codiert werden von einer Sequenz in Figuren 1a, 1b, 2a und 2b
- c) codiert wird von DNA-Sequenzen, die mit den in Figuren 1a, 1b, 2a und 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmenten dieser DNA-Sequenzen im DNA-Bereich, der für das reife Protein kodiert, hybridisieren, oder
- d) codiert wird von DNA-Sequenzen, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit den in b) bis c) definierten Sequenzen hybridisieren würden und für ein Polypeptid mit Aminosäuresequenz kodieren.

Bevorzugt sind Enzyme, welche von den Nukleotiden aus Figuren 1a, 1b, 2a und 2b oder von DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für ein Polypeptid mit derselben Aminosäuresequenz codieren würden, codiert werden.

11 05.08.99

Die beiden erfindungsgemäßen Enzyme (Sequenz in Figuren 3a und 3b) können als neue Prototypen von spezifischen Proteinen ein- und mehrzelliger Parasiten, insbesondere der einzelligen Parasiten angesehen werden.

Gegenstand dieser Erfindung sind Nukleinsäuren, welche für die Enzyme kodieren und ausgewählt sind aus der Gruppe

- a) der in den Figuren 1a, 1b, 2a, und 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder den komplementären Sequenzen,
- b) Nukleinsäuren-Sequenzen, die mit einer der Sequenzen von a) hybridisieren,
- c) Nukleinsäuren-Sequenzen, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit einer der in a) oder b) genannten Sequenzen hybridisieren würden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Enzyme aus anderen Parasiten, welche im wesentlichen Pyruvat und Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat kondensieren (DOXP-Synthase) und 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat umsetzen (DOXP-Reduktoisomerase). Diese den Malaria-Enzymen analogen Enzyme können dadurch erhalten werden, daß mit einer Hybridisierungsprobe, die für Malaria-Enzyme codierende Sequenzen enthält, eine cDNA-Bibliothek oder genomische Bibliothek des entsprechenden Parasiten nach dem Fachmann geläufigen Methoden gescreent wird oder über den Sequenzvergleich der DNA und Proteinsequenz für Malaria-Enzyme mit anderen Parasiten-Enzymen.

Mit Hilfe der Nukleinsäuren können erfindungsgemäße Enzyme in reproduzierbarer Weise in großen Mengen gewonnen werden. Zur Expression in prokaryontischen und eukaryontischen Or-

ganismen wird die Nukleinsäure nach dem Fachmann geläufigen Verfahren in geeignete Expressionsvektoren integriert. Vorzugsweise enthält ein solcher Expressionsvektor einen regulierbaren/induzierbaren Promotor. Zur Expression werden diese rekombinanten Vektoren dann nach bekannten Verfahren in geeignete Wirtszellen eingeführt und die transformierten, transfizierten bzw. transduzierten Wirtszellen unter Bedingungen kultiviert, die eine Expression des heterologen Gens ermöglichen. Als Wirtszellen eignen sich prokaryontische Zellen, wie z.B. *E. coli*, und eukaryontische Zellen, insbesondere Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*), Insektenzellen (z.B. Zelllinien von *Drosophila melanogaster* wie S2-Zellen, *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*), Wirbeltierzelllinien, vor allem Teratokarzinoma-Zelllinien wie CHO- oder COS-Zellen, und pflanzliche Zelllinien.

Die erfindungsgemäßen Enzyme können auch in transgenen Pflanzen und Tieren (z.B. Mäuse, Schafe, Ziegen, Schweine, Meerschweinchen) exprimiert werden. Das Expressionssystem ist dabei vorteilhafterweise durch dem Fachmann bekannte Techniken so zu gestalten, daß die produzierten Enzyme mit der Milch der Tiere ausgeschieden werden bzw. aus leicht zu gewinnenden Pflanzenteilen (Früchten, Blättern, Blüten, Sproß- und Wurzelteilen) erhalten werden können.

Als Expressionsvektoren eignen sich für Wirbeltierzelllinien besonders Systeme, die von Papillomaviren (z.B. SV40), Retroviren, Sindbisviren, Cytomegaloviren und Vacciniaviren abgeleitet sind. Für Insektenzellen eignet sich besonders das Baculovirus-System, für Pflanzenzellen Systeme auf der Basis des Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* und der Beschuß der Zellen mit Nukleinsäure-überzogenen Partikeln.

Von besonderer Bedeutung ist die Expression der erfindungsgemäßen Enzyme in Schleimpilzen wie *Dictyostelium discoideum*, *Polysphondylium pallidum* und *Physarum polycephalum*, da ihre Zellen kostengünstig in großen Mengen auf einfachen Medien kultiviert werden können. Die Verwendung von *Dictyostelium discoideum* bietet den weiteren Vorteil, daß dieser Organismus ähnliche Codone für die jeweiligen Aminosäuren benutzt wie *Plasmodium falciparum* und dadurch eine besonders effektive Produktion der erfindungsgemäßen Enzyme erreicht wird. Außerdem sind induzierbare Promotoren (z.B. durch Nahrungsmangel) für Expressionsvektoren für *Dictyostelium discoideum* bekannt. Dadurch kann die Ausbeute an rekombinantem Enzym weiter gesteigert werden.

Für die Expression der erfindungsgemäßen Enzyme eignen sich besonders solche Wirtszellen und Organismen, die keine intrinsischen Enzyme besitzen, die Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat kondensieren (DOXP-Synthase) und 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat umsetzen (DOXP-Reduktoisomerase). Dies trifft für Archaeobakterien, Tiere, Pilze, Schleimpilze und einige Eubakterien zu. Durch das Fehlen dieser intrinsischen Enzymaktivitäten wird die Detektion und Aufreinigung der rekombinanten Enzyme wesentlich erleichtert. Auch wird es erst dadurch möglich, mit geringem Aufwand die Aktivität und insbesondere die Hemmung der Aktivität der erfindungsgemäßen rekombinanten Enzyme durch verschiedenen Chemikalien und Pharmaka in Rohextrakten aus den Wirtszellen zu messen.

Die Expression der erfindungsgemäßen Enzyme erfolgt vorteilhafterweise dann in eukaryontischen Zellen, wenn post-

11.05.08.99

translatorische Modifikationen und eine native Faltung der Polypeptidkette erreicht werden soll. Außerdem wird in Abhängigkeit vom Expressionssystem bei der Expression genomischer DNA-Sequenzen erreicht, daß Introns durch Spleißen der DNA beseitigt und die Enzyme in der für die Parasiten charakteristischen Polypeptidsequenz produziert werden. Für Introns codierende Sequenzen können auch durch rekombinante DNA-Technologie aus den zu exprimierenden DNS-Sequenzen beseitigt oder experimentell eingefügt werden.

Die Isolierung des Proteins kann aus der Wirtszelle oder dem Kulturüberstand der Wirtszelle nach dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen. Es kann auch eine in vitro Reaktivierung der Enzyme erforderlich sein.

Zur Erleichterung der Aufreinigung können die erfindungsgemäßen Enzyme oder Teilsequenzen der Enzyme als Fusionsproteine mit verschiedenen Peptidketten exprimiert werden. Dazu eignen sich besonders Oligo-Histidin-Sequenzen und Sequenzen, die von der Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin oder Calmodulin-bindenden Peptiden abgeleitet sind. Fusionen mit Thioredoxin-abgeleiteten Sequenzen eignen sich besonders für prokaryontische Expression, da dadurch die Löslichkeit der rekombinanten Enzyme erhöht wird.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Enzyme oder Teilsequenzen der Enzyme als Fusionsprotein mit solchen, dem Fachmann bekannten, Peptidketten exprimiert werden, daß die rekombinanten Enzyme in das extrazelluläre Milieu oder in bestimmte Kompartimente der Wirtszellen transportiert werden. Dadurch kann sowohl die Aufreinigung, als auch die Untersuchung der biologischen Aktivität der Enzyme erleichtert werden.

11 05.08.99

Bei der Expression der erfindungsgemäßen Enzyme kann es sich als zweckmäßig erweisen, einzelne Codone zu verändern. Dabei ist der gezielte Austausch von Basen in der kodierenden Region auch sinnvoll, wenn die genutzten Codone in den Parasiten abweichend sind von der Codonnutzung im heterologen Expressionssystem, um eine optimale Synthese des Proteins zu gewährleisten. Zudem sind oft Deletionen von nicht-translatierten 5' bzw. 3'-Abschnitten sinnvoll, beispielsweise wenn mehrere destabilisierende Sequenzmotive ATTTA im 3'-Bereich der DNA vorliegen. Dann sollten diese bei der bevorzugten Expression in Eukaryonten deletiert werden. Veränderungen dieser Art sind Deletionen, Additionen oder Austausch von Basen und ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Enzyme unter standardisierten Bedingungen durch dem Fachmann bekannte Techniken durch in vitro-Translation gewonnen werden. Dafür geeignete Systeme sind Kaninchen-Reticulozyten- und Weizenkeim- Extrakte. Auch kann in vitro transskribierte mRNA in Xenopus-Oocyten translatiert werden.

Durch chemische Synthese können Oligo- und Polypeptide hergestellt werden, der Sequenzen aus der Peptidsequenz der erfindungsgemäßen Enzyme abgeleitet sind. Bei geeigneter Wahl der Sequenzen besitzen derartige Peptide Eigenschaften, die für die vollständigen erfindungsgemäßen Enzyme charakteristisch sind. Derartige Peptide können in großen Mengen hergestellt werden und eignen sich besonders für Studien über die Kinetik der Enzymaktivität, die Regulation der Enzymaktivität, die dreidimensionale Struktur der Enzyme, die Hemmung der Enzymaktivität durch verschiedenen Che-

11.05.88.99

mikalien und Pharmaka und die Bindungsgeometrie und Bindungsaffinität verschiedener Liganden.

Vorzugsweise wird zur rekombinanten Herstellung der erfindungsgemäßen Enzyme eine DNA mit den Nukleotiden aus den in den Figuren 1a, 1b, 2a und 2b dargestellten Sequenzen verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Gewinnung der Enzyme, die beteiligt sind am DOXP-Stoffwechselweg, insbesondere die Enzyme DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase durch Isolierung aus den Parasiten. Die Isolierung der Enzyme erfolgt aus Parasiten-Extrakten über chromatographisch, elektrophoretische und andere dem Fachmann bekannte Verfahren. Die Enzyme werden mittels Messung der jeweiligen enzymatischen Aktivität oder Reaktivität mit entsprechenden Antikörpern ermittelt.

Der Nachweis von transformierten, transfizierten bzw. transduzierten Wirtszellen, welche die Enzyme rekombinant produzieren, sowie die Aufreinigung des Proteins erfolgen vorzugsweise über Antikörper, die an diese Enzyme binden. Derartige Antikörper sind mit Hilfe der erfindungsgemäßen Enzyme oder Teile der Enzyme als Antigen oder Immunogen in einfacher Weise nach bekannten Verfahren erhältlich.

Mit den erfindungsgemäßen Antikörper gegen die Proteine können beispielsweise durch Western-Blotting-Analysen homologe bzw. kreuzreagierende Proteine anderer Parasiten detektiert werden.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind Methoden zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DOXP-Enzyme, ins-

besondere der Enzyme DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase. Dies kann nach den bekannten Anleitungen bestimmt werden (Sprenger et al. PNAS, 94 (1997) 12857-62 und Kuzuyama et al. Tetrahedron Letters 39 (1998) 4509-12). Hierbei wird die Kondensation von Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP-Synthase) und die Umwandlung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (DOXP-Reduktoisomerase) detektiert. Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist die Verwendung dieser Meßverfahren zur Ermittlung von Stoffen, die die Aktivität der jeweiligen Enzyme inhibieren.

Durch die Anwendung der rekombinanten Technologie ist es möglich, eine Vielzahl von Varianten von Enzymen oder Teilstücken von Enzymen herzustellen. Derartige Derivate können beispielsweise modifiziert sein in einzelnen oder mehreren Aminosäuren durch Substitution, Deletion oder Addition. Die Derivatisierung kann beispielsweise über site directed mutagenesis (ortsspezifische Mutagenese) erfolgen. Derartige Variationen sind für einen Fachmann ohne weiteres durchführbar. Es muß lediglich sichergestellt sein, daß die charakteristischen Eigenschaften der Enzyme erhalten bleiben.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Enzyme und ihrer Homologen können neue spezifische Wirkstoffe gegen Parasiten gefunden werden.

Insbesondere können die oben beschriebenen Detektionsmethoden in geeigneten Testkits zum Screening auf antiparasitäre Wirkung von Stoffen verwendet werden. Hierzu gehören Methoden, die dem Fachmann bekannt sind und sich zum Screening von Naturstoffen aus Flora und Fauna, aus Pflanzen,

17.05.99

Algen, Bakterien oder Tieren eignen, und deren Derivate, chemischen Libraries, auch Libraries, die mittels dem Fachmann bekannten Techniken, einschließlich der kombinatorischen Chemie erstellt wurden (Pindur et al. Pharmazie in unserer Zeit 26 (1997) 24-30; Broach et al. Nature 384 (1997) 14-6; Lack et al. Chimia 50 (1996) 445-7; Czarnik und Ellmann Accounts of chemical research 29 (1996); Chemical and engineering News 74 (1996) 28-73; Lorin et al. Chemical reviews 96 (1996) 555-600; Weber et al. Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium 42 (1994) 698-702).

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung von Proteinen oder Teilstücke dieser Proteine, hierzu gehören Proteine oder Teilstücke von Proteinen mit oder auch ohne enzymatischer Aktivität in dem Fachmann bekannten Techniken zur Ermittlung von Strukturen des Proteins, insbesondere die Charakterisierung der Bindungsstellen, die sich zum Entwerfen von Liganden eignen, die sich für die Entwicklung von Mittel mit inhibierender Wirkung auf die enzymatische Aktivität eignen. Übersichtsarbeiten sind dem Fachmann bekannt (Böhme et al. Wirkstoffdesign, der weg zum Arzneimittel von Böhm Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996; Cohen, Guidebook on molecular modelling in drug design, Academic Press, London 1996; Höltjes und Folkers, Molecular modelling, basic principles and applications, in methods and principles in medicinal Chemistry, Band 5, VCH, Weinheim 1996; Krosgaard et al. A textbook of drug design and development, 2. Auflage, Haarwood academic publishers, Amsterdam 1996)

11 05.08.99

Wirkstoffe die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Proteine aufgefunden werden, sind für die Medizin und der Tiermedizin von hohem Interesse.

Die Wirkstoffe, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Proteine gefunden werden, eignen sich bei günstiger Warmblütertoxizität zur Bekämpfung von pathogenen Parasiten, die bei Menschen und in der Tierhaltung und Tierzucht bei Nutz-, Zucht-, Zoo-, Labor-, Versuchs- und Hobbytieren vorkommen. Sie sind dabei gegen alle oder einzelne entwicklungsstadien der Schädlinge, sowie gegen resistente und normal sensible Parasiten wirksam. Durch die Bekämpfung der Parasiten sollen Krankheiten, Todesfälle und Leistungsminderungen (z.B. bei der Produktion von Fleisch, Milch, Wolle, Häuten, Eiern usw.) vermindert werden, so daß der Einsatz der Wirkstoffe eine wirtschaftlichere und einfachere Tierhaltung möglich ist.

Unter Verwendung dieser erfindungsgemäßen Verfahren einschließlich der etablierten Assays (Ansätze) konnten wir zeigen, daß die Aktivität der DOXP-Reduktoisomerase durch 3-(N-acetyl-N-hydroxyamino)propylphosphonat und derivative 3-(N-formyl-N-hydroxyamino)propylphosphonat (fosmidomycin) gehemmt wird. Beide Substanzen stammen aus einer chemischen Library von Acylhydroxylaminoalkylphosphonsäurederivaten. Diese Verbindungsgruppe wurde in der Vergangenheit beschrieben als Herbizide und als bakterizid (US 4693742, DE2733658). Hier zeigte sich die Effizienz des Systems für das Auffinden von antiparasitären Wirkstoffen. Die Ergebnisse aus den Enzymassays konnten auch in der Malariakultur (Siehe Beispiele) und im Tierversuch (Siehe Beispiele) bestätigt werden. Die mittels dieser Enzymassays ermittelten Inhibitoren konnten das Wachstum von Malaria- Parasiten in

11.05.68.99

vitro und in vivo hemmen. Eine Behandlung der Tiere über einem Zeitraum von 8 Tagen zeigte eine Heilung der Tiere. Hier zeigte die Acetylform eine dreifach höhere Wirksamkeit als die Formylform. Dieses Ergebnis ist sehr überraschend, da wesentlich höhere (bis zu 1000x) Konzentrationen 3-(N-acetyl-N-hydroxyamino)propylphosphonat benötigt werden, um das Bakterienwachstum zu hemmen.

Damit eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäßen Mittel zur therapeutischen und prophylaktischen Behandlung von Infektionen bei Mensch und Tier geeignet, die durch Parasiten, Pilze oder Viren hervorgerufen werden. Die Verbindungen sind insbesondere als Malariaprophylaxe und als Prophylaxe der Schlafkrankheit sowie der Chagas-Krankheit, der Toxoplasmose, der Amöbenruhr, der Leishmaniosen, der Trichomoniasis, der Pneumozystose, der Balantidiose, der Kryptosporidiose, der Sarkozystose, der Akanthamöbose, der Naeglerose, der Kokzidiose, der Giardiose und der Lambliose geeignet.

Die erfindungsgemäßen Mittel zeigten eine Wirkung gegen ein- und mehrzellige Parasiten, insbesondere gegen einzellige Parasiten (Protozoen), insbesondere gegen Erreger der Malaria und der Schlafkrankheit sowie der Chagas-Krankheit, der Toxoplasmose, der Amöbenruhr, der Leishmaniosen, der Trichomoniasis, der Pneumozystose, der Balantidiose, der Kryptosporidiose, der Sarkozystose, der Akanthamöbose, der Naeglerose, der Kokzidiose, der Giardiose und der Lambliose.

Die erfindungsgemäßen Verfahren und erfindungsgemäßen Mittel eignen sich besonders zur Behandlung der Malaria, der Schlafkrankheit und der Leishmaniosen.

14.05.08.99

Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe eignen sich auch zur Inhibition von Bakterien, und von Pflanzen. Damit eignen sich Substanzen, die erfindungsgemäß als Inhibitoren des DOXP-Stoffwechselweges identifiziert werden, auch zur Anwendung als Herbizide und zur Anwendung bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen bei Mensch und Tier.

Zu den Nutz- und Zuchttieren gehören Säugetiere, wie z.B. Rinder, Pferde, Schafe, Schweine, Ziegen, Kamele, Wasserbüffel, Esel, Kaninchen, Salz- und Süßwasserfische, wie z. B. Forellen, Karpfen und Aale.

Zu den Labor- und Versuchstieren gehören Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Goldhamster, Hunde, Katzen und Schweine.

Zu den Hobbytieren gehören Hunde und Katzen.

Die Anwendung kann sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch erfolgen.

Die Anwendung der Wirkstoffe erfolgt direkt oder in Form von geeigneten, dem Fachmann bekannten Zubereitungen wie enteral, parenteral, dermal oder nasal.

Die erfindungsgemäßen Mittel können in Kombination mit allen dem Fachmann bekannten Antiinfektiva verwendet werden. Hierzu gehören Substanzen, die antibakterielle, antiparasitäre, antivirale oder fungizide Wirkungen haben. Hierzu gehören Antiinfektiva, die in der Roten Liste und in der Fachliteratur (Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie von Forth et al. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim 1998; Antibiotikatherapie von Simon und Stille, Schattauer-Verlag, Stuttgart 1993) aufgeführt sind.

Da einige Parasiten sowohl über dem Mevalonat-Stoffwechselweg, als auch über dem DOXP-Stoffwechselweg

14.05.08.99

verfügen, betrifft die Erfindung insbesondere die Kombination von Inhibitoren des DOXP-Stoffwechselweges mit Mitteln, die den Fettstoffwechselweg inhibieren, einschließlich Inhibitoren der Synthese oder der Aufnahme von Lipiden, insbesondere Inhibitoren des Mevalonat-Stoffwechselweges. Hier seien insbesondere die Inhibitoren der Enzyme HMG-CoA-Synthase und Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase genannt. Zu den Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase zählen insbesondere Lovastatin und Derivate, Mevastatin und Derivate, Compactin und Derivate, Simvastatin und Derivate, Pravastatin und Derivate, Atorvastatin und Derivate, Fluvastatin und Derivate und Cerivastatin und Derivate.

Beispiel 1

Expressionsklonierung des für die DOXP-Reductoisomerase codierenden Gens von *P. falciparum*.

Die Klonierung des für die DOX-Reductoisomerase von *P. falciparum* codierenden Gens erfolgte durch PCR-Amplifikation der entsprechenden Sequenzen von genomischer DNA als Matrix. Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde der *P. falciparum*- Stamm HB3 nach der Kerzentopf-Methode kultiviert (Tranger und Jensen (1976), Science 193, 673-675). Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 (mit HEPES und L-Glutamin, Gibco) mit 10 % humanem Serum, 0.3 µg / ml Gentamycin und 0.1 mM Hypoxanthin supplementiert und mit humanen Erythrozyten ein Hämatokrit von 5 % eingestellt. Für die Präparation der DNA wurden 15 Kulturschalen mit je 35 ml Kulturvolumen bei ca. 4 % Parasitämie verwendet. Die infizierten Erythrozyten wurden durch Zentrifugation geerntet und zweimal in Trager-Puffer (57 mM NaCl, 58 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 7 mM K₂HPO₄, 11

14.05.08.99

mM NaHCO₃, 14 mM Glucose) gewaschen. Die Parasiten wurden aus den Erythrozyten freigesetzt, indem das Zellsediment mit einem 10fachen Volumen 1 %iger Saponinlösung in Trager-Puffer für 5 min auf Eis lysiert wurde (modifiziert nach Kilejian (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4650-4653). Die freien Parasiten wurden zweimal durch Zentrifugation (10 min, 10.000 rpm, 4 °C) mit einer Lösung von 1 % BSA in Trager-Puffer gewaschen. Die DNA-Präparation aus den gewonnenen freien Parasiten erfolgte nach Standardprotokollen. Zunächst wurden die Parasiten mit Proteinase K verdaut. Dann wurde der Ansatz viermal mit Phenol / Chloroform extrahiert, die DNA-Lösung über Nacht gegen TE dialysiert und anschließend mit Isopropanol präzipitiert. Für die PCR-Amplifikation wurden folgende Primer verwendet:

PfYAEMfor 5'-CTGAATTTTCATATTACAAAATTAATAGATG-3'

PfYAEMrev 5'-GTACTATGAAGAATTATGTTTGTGTATAT-3'.

Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

3 µl 10 x PCR-Puffer
2,4 µl 25 mM MgSO₄
2,4 µl 2,5 mM dNTP
2 µl Matrizen-DNA (0,2 µg / ml)
2 µl Primer 1 (7,5 µM)
2 µl Primer 2 (7,5 µM)
0.2 µl Taq-Polymerase (5 U / µl)
16 µl H₂O

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Profil:

3 Zyklen: 96°C 1 min
 48°C 1 min

14.05.06.99

72°C 3 min
32 Zyklen: 95 °C 40 sec
48°C 1 min
72°C 3 min

Nach dem letzten Zyklus wurde der Ansatz zur vollständigen Verlängerung aller Produkte noch 10 min bei 72°C inkubiert. Das PCR-Produkt von 4 derartigen Ansätzen wurde vereinigt und über ein 0.7 %iges Agarosegel gereinigt. Die Elution der DNA aus dem Agaroseblöckchen erfolgte mit dem „Kit for DNA extraction“ (Millipore, Kat. Nr. S667). Die eluierte DNA wurde mit Ethanol präzipitiert und in 10 µl H₂O aufgenommen. Anschließend wurde das PCR-Produkt nach den Vorschriften des Herstellers mit dem TA-cloning kit (Invitrogen) kloniert. Dabei wurden 20 ng insert-DNA für einen Ligationsansatz verwendet. Bakterienkolonien, die das gewünschte rekombinante Plasmid trugen, wurden durch analytische Plasmidpräparation und EcoR I- Verdau der Plasmide identifiziert. Die klonierten PCR-Produkte wurden dann unter Verwendung von Standard- Forward- und Reverse-Primern sequenziert; die Sequenzen wurden mit der Technik des Primer Walkings vervollständigt.

Für die Expression in COS-7- Zellen wurde ein PCR-Produkt, das in der entsprechenden Orientierung im pCR2.1-Vektor vorlag, in den Expressionsvektor pBK-CMV (Stratagene) umkloniert. Die Umklonierung erfolgte dabei über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Not I und BamH I, die im Polylinker beider Vektoren vorkommen. Für die Transfektion der COS-7-Zellen wurde der Expressionsvektor mit dem PCR-Produkt als Insert über Anionenaustausch-Chromatographie (Qiagen) im präparativen Maßstab hergestellt.

Alle für die Klonierung verwendeten Methoden sind ausführlich beschrieben in J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis

14.05.08.99

(1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

Die COS-7-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS unter Standardbedingungen kultiviert. Pro Zellkulturflasche wurden 30 ml Kulturmedium berechnet. Für die Transfektion wurden Zellen bei ca. 50 % Konfluenz verwendet, die am Vortag frisch gesplittet worden waren. Als Transfektionsreagenz wurde DOTAP (Boehringer) verwendet. 40 µl DNA-Lösung (0,5 µg / ml) wurden mit 110 µl 20 mM HEPES (pH 7,4) gemischt. Außerdem wurden 100 µl DOTAP mit 230 µl 20 mM HEPES (pH 7,4) in einem Polystyrol-Reaktionsgefäß gemischt. Dann wurde die DNA-Lösung zu der DOTAP-Lösung zupipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 20 ml Kulturmedium gemischt und das Medium der COS-7-Zellen durch dieses Gemisch ersetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Medium in neue Zellkulturflaschen transferriert. Nach weiterer 48stündiger Inkubation wurden die transfizierten COS-7-Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen abgeschabt und dreimal durch Zentrifugation in Assay-Puffer (100 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM MnCl₂) gewaschen. Die Zellen wurden in einem minimalen Volumen Assay-Puffer resuspendiert und durch dreimaliges Einfrieren (in flüssigem Stickstoff) und Auftauen aufgeschlossen. Zellfragmente wurden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13 000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand direkt für die Messung der Enzymaktivität oder zur Aufreinigung des Enzyms verwendet.

Beispiel 2

14.05.00.99

Reinigung der rekombinanten DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum*

Zur genaueren Charakterisierung wurde die in COS-7-Zellen exprimierte rekombinante DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* zur weitgehenden Homogenität aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte über einen affinitätschromatographischen und einen gelpermeationschromatographischen Schritt.

Zur Herstellung einer geeigneten Affinitätschromatographie-Säule wurden zunächst Antikörper gegen die DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* hergestellt. Dazu wurden aus der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz solche Abschnitte ausgewählt, für die eine besonders hohe antigene Wirkung vorausgesagt werden konnte. Entsprechende Peptide wurden synthetisiert und für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Qualität der erhaltenen Antiseren wurde sowohl anhand ihrer Reaktivität mit den synthetischen Peptiden, als auch durch Western blot-Analysen bestätigt. Für die Western blot-Analysen (BM Western Blotting Kit, Boehringer) wurden Extrakte aus *P. falciparum* und rekombinanten COS-Zellen verwendet.

Zur Herstellung der Affinitätschromatographie-Säule wurde das Antiserum zur Beseitigung niedermolekularer Amine gegen PBS dialysiert. Die Antikörper wurden dann an Protein A-Sepharose gebunden und durch Cross-linking mit DMP kovalent gekoppelt (IgG Orientation Kit, Pierce). Der Proteinextrakt wurde wie in Beispiel 1 beschrieben aus 55 Zellkulturflächen mit transfizierten COS-7-Zellen gewonnen und auf die mit Assay-Puffer äquilibrierte Säule geladen. Nach exzessivem Waschen mit Assay-Puffer wurde die Säule mit Elutions-Puffer (100 mM GlycinHCl (pH 2,8), 0.4 % CHAPS) eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 1 M TrisHCl (pH 7,5) neutralisiert. Die Hauptfraktionen wurden durch Western blot-Analyse

identifiziert. Dazu wurden für die Detektion biotinylierte Antikörper verwendet, um eine Störung durch von der Säule in geringer Menge eluierte Antikörper zu vermeiden. Die Hauptfraktionen wurden vereinigt, gegen Assay-Puffer dialysiert und durch Ultrafiltration (30 kDa, Amicon) konzentriert. Die weitere Reinigung erfolgte durch Gelpermeationsschromatographie (Superdex 200, Pharmacia) mit Assay-Puffer als Start- und Elutions-Puffer. Die Hauptfraktionen wurden wie oben beschrieben identifiziert, vereinigt und konzentriert, mit 20 % Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren. Durch SDS-PAGE (12 % Acrylamid) unter reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung (Gelcode Colour Silver Stain Kit, Pierce) wurde die gereinigte DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* als einheitliche Bande bei 54 kDa dargestellt.

Beispiel 3

Bestimmung der Aktivität des gereinigten Enzyms und Screening nach Inhibitoren

Die DOXP-Reductoisomerase-Aktivität des gereinigten Enzyms wurde in einem *in vitro*-Versuchssystem bestätigt. Für einen typischen Versuchsansatz wurden 100 μl Assay-Puffer mit 0,3 mM NADPH, 0,3 mM DOXP und 10 μg rekombinantem Enzym verwendet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von DOXP zum kompletten Ansatz gestartet. Die Oxidation von NADPH wurde photometrisch bei 340 nm in Mikroquarzküvetten bei 37°C verfolgt. Dieses Versuchssystem wurde verwendet, um die Inhibition der rekombinanten DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* durch verschiedene Substanzen zu zeigen. Nach Zugabe von 1 μM 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propylphosphonsäure-mononatriumsalz und 1 μM 3-(N-Acetyl-N-

27
14.05.88.99

hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz zum Reaktionsansatz war keine Veränderung der Absorption bei 340 nm zu beobachten. Unter diesen Bedingungen wurde die DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* vollständig inhibiert.

Beispiel 4

Test der Wirksamkeit der Substanzen gegen Malaria *in vivo*

Die verschiedenen Derivate wurden nach dem modifizierten Peters' Test getestet. Die Substanzen wurden dabei in einem Viertel der halblethalen Dosis (LD50) appliziert. Bei dem Versuchsansatz wurden zehn Mäuse mit *Plasmodium vinckei*, dem Erreger der Mäusemalaria, infiziert. Nach Bestätigung der Infektion durch Blutuntersuchung erfolgte die Behandlung in vier Mäusen. Als Kontrolle dienten sechs Mäuse, die nicht behandelt wurden. Die Behandlung mit 1-1000 mg/kg/d, 3-(N-Formyl-N-Hydroxylamino)-propylphosphonsäuremononatriumsalz über 3 Tage führte zu einer Abtötung der Parasiten im Blut der Mäuse. Die behandelte Gruppe war bereits nach einem Tag frei von lebenden Parasiten. Die Kontrollmäuse mußten am Tag 5 nach Infektion bei einer Parasitämie von > 80% getötet werden. Die behandelten Mäuse waren auch 8 Wochen nach Behandlungsende immer noch frei von Parasiten. Weitere Experimente zeigten eine Wirksamkeit von 50 mg/kg/d 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz in Mäusen mit einer Parasitämie von 80%. Auch diese Mäuse waren nach 1 Tag frei von lebenden Parasiten. Die weiteren Ergebnisse für 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz und 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz sind in Figur 5 dargestellt.

Beispiel 5

Schutzwirkung vor Malaria beim Versuch mit infizierten Mäusen

Die Wirksamkeit der Verbindungen in vivo gegenüber Malaria wurde unter Heranziehen von 20 bis 25 g schweren männlichen Mäusen (BALB/c-Stamm) getestet. Einen Tag vor der Infektion wurden vier Mäuse intraperitoneal mit 50 mg/kg 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propylphosphonsäure-mononatriumsalz behandelt. Die Mäuse wurden dann mit Plasmodium vinckei infiziert. Mäuse, die nicht mit der Substanz vorbehandelt wurden, dienten als Kontrolle. Es konnte in den behandelten Mäusen keine Infektion nachgewiesen werden, während die Kontrollmäuse nach 5 Tagen mit einer Parasitämie über 80% getötet werden. Die behandelten Mäuse waren auch 8 Wochen nach der Infektion frei von Parasiten.

Beispiel 6

In vitro Inhibition des Wachstums von Malaria Parasiten
Zum Prinzip der IC₅₀-Bestimmung (die Konzentration, bei der die Vitalität der Parasiten um die Hälfte reduziert wird)

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte werden die Malaria-Parasiten zunächst für einen vollständigen 48-Stunden-Zyklus in Gegenwart von Inhibitoren kultiviert, in den anschließenden 24 Stunden wurde die Überlebensrate durch [³H]-Hypoxanthin-Einbau gemessen. Auf einer Mikrotiterplatte wird eine Verdünnungsreihe von 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propylphosphonsäuremononatriumsalz in 10-fach konzentrierten 20-µl-Aliquots vorgelegt. Dann werden zu jedem Well 180 µl Parasitensuspension in Kulturmedium zugefügt. Es werden

14.05.08.99

asynchrone Kulturen mit ca. 0,4% Parasitämie und 2 % Hämatokrit verwendet. Anschließend werden die Mikrotiterplatten für 48 h inkubiert. Dann werden zu jedem Well 30 μ l [3 H]-Hypoxanthin zugefügt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und die inkorporierte Radioaktivität wurde gemessen. In den Figuren 6a, 6b und 6c sind die Ergebnisse mit den Stämmen HB3, A2 und Dd2 mit bekannten Resistenzen gegen andere Malaria-Medikamente dargestellt. In beiden Stämmen ergibt sich ein IC-50-Wert von unter 0,5 μ M. Die Resistenzen dieser Stämme sind:

Plasmodium falciparum HB3 (Honduras) ist gegen Pyrimethamin resistent.

Plasmodium falciparum Dd2 (Indochina) ist gegen Cloroquin, Chinin, Pyrimethamin, Cycloguanil und Sulfadoxin resistent.

Plasmodium falciparum A2 (Gambia) ist gegen Chloroquin und Cycloguanil resistent.

Es wurden keine Kreuzresistenzen mit Anti-Malaria-Mitteln gefunden.

11.05.00.99

Patentansprüche

1. Mittel zur Vorbeugung und Behandlung von Infektionskrankheiten, verursacht durch ein- oder mehrzellige Parasiten, gekennzeichnet dadurch, daß es eine die Enzyme oder Co-faktoren des 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweges hemmende Substanz enthält.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von Glycerinaldehyd und Pyruvat zu 1-Deoxy-D-Xylulose hemmt.
3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu Isopentenyl-diphosphat hemmt.
4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Bildung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat hemmt.
5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat zu 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat hemmt.
6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat hemmt.
7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Bildung von 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat hemmt.

11.05.09.99

8. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat hemmt.
9. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat hemmt.
10. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat zu Isopentenylidiphosphat hemmt.
11. Mittel nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es die Produktion der beteiligten Enzyme oder der beteiligten Co-Faktoren hemmt.
12. Mittel nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es den Abbau der beteiligten Enzyme oder beteiligten Co-Faktoren fördert.
13. Mittel nach den Ansprüchen 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß es den Umsatz des Enzyms 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase oder 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktase hemmt.
14. Verwendung von Mitteln nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Behandlung von Infektionskrankheiten, verursacht durch ein- oder mehrzellige Parasiten bei Mensch und Tier.
15. Pharmazeutischen Mittel nach einem der Ansprüche 1-13, das einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweist.

11³² 05.08.99

16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Mittel mindestens einen weiteren wirksamen pharmazeutischen Wirkstoff aufweist.
17. Arzneimittel, nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Mittel ein Hemmer der Fettstoffwechselwege und der Cholesterinsynthese und der Cholesterinaufnahme ist.
18. Arzneimittel nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Mittel ein HMG-CoA-Reduktase-Hemmer oder ein HMG-CoA-Synthase-Hemmer ist.
19. Arzneimittel nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Mittel ein oder mehrere Bestandteile der Gruppe aufweist, die besteht aus Lovastatin, Mevastatin, Compactin, Simvastatin, Pravastatin, Atorvastatin, Fluvastatin und Cerivastatin.
20. Verwendung von Arzneimitteln nach den Ansprüchen 1-19 für die Behandlung von Infektionen verursacht durch Bakterien.
21. Verwendung von Mitteln nach den Ansprüchen 1-19 als Herbizide.
22. Protein mit oder ohne 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase Aktivität, welches am 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Stoffwechselweges beteiligt ist und a) codiert wird von der in Sequenz 1b und 2b gezeigten DNA-Sequenz b) codiert wird von DNA-Sequenzen, die mit den in Sequenz 1b oder 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmenten

dieser DNA-Sequenzen im DNA-Bereich, der für das reife Protein codiert, hybridisieren.

23. Protein mit oder ohne 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase Aktivität, welches am 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweges beteiligt ist und a) codiert wird von der in Sequenz 1a und 2a gezeigten DNA-Sequenz, b) codiert wird von DNA-Sequenzen, die mit den in Sequenz 1a oder 2a gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmenten dieser DNA-Sequenzen im DNA-Bereich, der für das reife Protein codiert hybridisieren.
24. Proteine nach den Ansprüchen 22 oder 23 und weitere Proteine, die am 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweges beteiligt sind und erhältlich sind aus den Kulturüberständen von Parasiten oder aus den aufgeschlossenen Parasiten und Aufreinigung über chromatographische und elektrophoretische Techniken.
25. Proteine nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es a) das Produkt einer prokaryontischen oder eukaryontischen Expression einer exogenen DNA sind, b) codiert werden von den Sequenzen 1a, 1b, 2a oder 2b oder codiert wird von DNA-Sequenzen, die mit den in den Sequenzen 1a, 1b, 2a oder 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmenten dieser DNA-Sequenzen im DNA-Bereich, der für das reife Protein codiert, hybridisieren, oder c) codiert werden von DNA-Sequenzen, die ohne Degeneration des genetischen Codes mit den in b) definierten Sequenzen hybridisieren würden und für ein Polypeptid mit entsprechender Aminosäure-Sequenz kodieren.

26. Protein gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, welches aus den Aminosäuren von Sequenz 2a, 2b, 3a, 3b besteht.
27. Nukleinsäure welche für ein Protein gemäß einem der vorangehenden Ansprüche kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgewählt ist aus der Gruppe a) der in Sequenz 1a, 1b, 2a, 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder der komplementären DNA-Sequenzen, b) Nukleinsäure-Sequenzen, die mit der Sequenz von a) hybridisieren, c) Nukleinsäure-Sequenzen, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit einer der in a) oder b) genannten Sequenzen hybridisieren würden.
28. DNA mit der in Sequenz 1a gezeigten Sequenz.
29. DNA mit der in Sequenz 1b gezeigten Sequenz.
30. DNA mit der in Sequenz 2a gezeigten Sequenz.
31. DNA mit der in Sequenz 2b gezeigten Sequenz.
32. Rekombinanter Expressionsvektor, der DNA enthält, die für ein Protein nach den Ansprüchen 22 bis 26 codiert und in einem transformierten Mikroorganismus oder einem transformierten eukaryontischen Zelle, oder in einem Tier oder eine Pflanze die proteincodierende DNA exprimiert.
33. Prokaryontische Wirtszelle, eukaryontische Wirtszelle Tiere und Pflanzen, welche mit einer DNA, die für ein Protein nach den Ansprüchen 22 bis 26 kodiert, transfiziert ist und das genannte Protein produzieren kann.

34. Wirtszelle nach Anspruch 33, die E. coli oder eine Säugerzelllinie ist.
35. Verwendung von DNA, die für ein Protein nach den Ansprüchen 22 bis 26 kodiert, zur Transfektion eines prokaryontischen oder eukaryontischen Organismus.
36. Verfahren zur Gewinnung eines Proteins, das am 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg beteiligt ist aus Parasiten oder aus Kulturüberständen von Parasiten-Kulturen über chromatographische und elektrophoretische Techniken.
37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei das Protein 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase oder 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase ist.
38. Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Proteins, daß am 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg beteiligt ist durch Expression der DNA aus einem der vorangehenden Ansprüche in einer geeigneten Wirtszelle und Isolierung des Proteins aus der Wirtszelle oder aus dem Kulturüberstand der Wirtszelle.
39. Verwendung eines Proteins aus dem 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg gemäß einem der vorangehenden Ansprüche als Antigen oder Immunogen zur Herstellung von Antikörpern, die an dieses Protein binden.
40. Antikörper gegen ein Protein aus dem 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, erhältlich durch in-vitro-

11³⁶05.08.99

Immunisierungstechniken oder durch Immunisierung eines Tieres mit einem Protein gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen und Gewinnung der Antikörper aus dem Serum oder aus den Milzzellen der immunisierten Tiere.

41. Verwendung eines Proteins gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen zur Identifizierung von anti-parasitär wirkenden Stoffen.
42. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen zur Identifizierung eines antiparasitär wirkenden Stoffes.
43. Testsysteme unter Verwendung eines Proteins gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen zur Identifizierung eines antiparasitär wirkenden Stoffes.
44. Testsysteme unter Verwendung eines Proteins gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen zur Identifizierung eines antiparasitär wirkenden Stoffes.
45. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, welche ein Protein gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen codieren, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Probe mit einer Nukleinsäuresonde inkubiert wird, welche aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus a) der in den Figuren 1a und 1b gezeigten DNA-Sequenzen oder der dazu komplementären Sequenz, b) Nukleinsäuren, die mit einer der Sequenzen von a) hybridisieren bestehen, die Nukleinsäuresonde mit der Nukleinsäure der Probe inkubiert wird und die Hybridisierung ggf. über einen weiteren Bindepartner von Nukleinsäuresonde nachgewiesen wird.

11³⁷ 05.08.99

46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß die nachzuweisende Nukleinsäure vor dem Nachweis amplifiziert wird.
47. Herstellung und Verwendung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase oder 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen.
48. Verwendung nach Anspruch 14 zur Behandlung von Malaria, der Schlafkrankheit und der Leishmaniosen.

M 05.09.99

10
ATGAAGAAATATATTTATATATATTTTTCTTCATCACTAACTATTAATGATTAGTA

70 90 110
ATAAATAATACATCAAAATGTGTTTCCATTGAAAGAAGAAAAATAACGCATATATAAAT

130 150 170
TATGGTATAGGATATAATGGACCAGATAATAAAATAACAAAGAGTAGAAGATGTAAAAGA

190 210 230
ATAAAGTTATGCAAAAAGGATTTAATAGATATTGGTGCAATAAAGAAACCAATTAATGTA

250 270 290
GCAATTTTTGGAAGTACTGGTAGTATAGGTACGAATGCTTTAAATATAATAAGGGAGTGT

310 330 350
AATAAAATTGAAAATGTTTTAATGTTAAAGCATTGTATGTGAATAAGAGTGTGAATGAA

370 390 410
TTATATGAACAAGCTAGAGAATTTTTACCAGAATATTTGTGTATACATGATAAAAGTGTA

430 450 470
TATGAAGAATTAAAGAGTTGGTAAAAAATATAAAAGATTATAAACCTATAATATTGTGT

490 510 530
GGTGAGAAGGGAAAAGAAATATGTAGTAGTAATAGTATAGATAAAATAGTTATTGGTATT

550 570 590
GATTCTTTTCAAGGATTATATTCTACTATGTATGCAATTATGAATAATAAAATAGTTGCG

610 630 650
TTAGCTAATAAAGAATCCATTGTCTCTGCTGGTTTCTTTTTAAAGAAATTATTAAATATT

670 690 710
CATAAAAATGCAAAGATAATACCTGTTGATTTCAGAACATAGTGCTATATTTCAATGTTTA

730 750 770
GATAATAATAAGGTATTAAAAACAAAATGTTTACAAGACAATTTTTCTAAAATTAACAAT

790 810 830
ATAAATAAAATATTTTTATGTTTCATCTGGAGGTCCATTTCAAATTTAACTATGGACGAA

850 870 890
TTAAAAAATGTAACATCAGAAAATGCTTTAAAGCATCCTAAATGGAAAATGGGTAAGAAA

910 930 950
ATAACTATAGATTCTGCAACTATGATGAATAAAGGTTTAGAGGTTATAGAAACCCATTTT

970 990 1010
TTATTTGATGTAGATTATAATGATATAGAAGTTATAGTACATAAAGAATGCATTATACAT

1030 1050 1070
TCTTGTGTTGAATTTATAGACAAATCAGTAATAAGTCAATGTATTATCCAGATATGCAA

1090 1110 1130
ATACCCATATTATATTCTTTAACATGGCCTGATAGAATAAAAACAAATTTAAACCTTTA

1150 1170 1190
GATTTGGCTCAGGTTTCAACTCTTACATTTTATAAACCTTCTTTAGAACATTTCCCGTGT

1210 1230 1250
ATTAAATTAGCTTATCAAGCAGGTATAAAAGGAACTTTTATCCAAGTACTAAATGCG

Fig. 1a Teil 1

11.05.05.99

```
      1270      1290      1310
TCAAATGAAATAGCTAACAACTTATTTTGAATAATAAAATTAAATATTTTGATATTCC

      1330      1350      1370
TCTATAATATCGCAAGTTCTTGAATCTTTCAATTCTCAAAAGGTTTCGGAAAATAGTGAA

      1390      1410      1430
GATTTAATGAAGCAAATTCTACAAATACATTCCTGGGCCAAAGATAAAGCTACCGATATA

      1450
TACAACAAACATAATTCTTCA
```

Fig. 1a Teil 2

14.05.08.09

1 GATGAAATAT ATAAAGAAAT ATATGAAC TA TATGTAGAAA GAAATATTCC
51 TGAATATTAT GAACGAAAAT ATTTTTCAGA AGATATTAAA AAGAGTGTCC
101 TATTTGATAT AGATAAATAT AATGATGTCG AATTTGAAAA AGCTATAAAA
151 GAAGAATTTA TAAATAATGG AGTTTATATT AATAATATAG ATAATACATA
201 TTATAAAAAA GAAAATATTT TAATAATGAA AAAGATATTA CATTATTTCC
251 CATTATTAAA ATTAATTAAT AATCCATCAG ATTTAAAAA GTTAAAAA
301 CAATATTTAC CTTTATTAGC ACATGAATTA AAAATATTTT TATTTTTTAT
351 TGTAAATATA ACAGGAGGTC ATTTTTCCTC TGTTTTAAGC TCTTTAGAAA
401 TTCAATTATT ATTATTGTAT ATTTTAAATC AACCATATGA TAATGTTATA
451 TATGATATAG GACATCAAGC ATATGTACAT AAGATATTGA CCGGAAGAAA
501 ACTATTATTT CTATCATTAA GAAATAAAAA AGGTATTAGT GGATTCCTAA
551 ATATTTTTGA AAGTATTTAT GATAAATTTG GGGCTGGTCA CAGTCCACT
601 TCATTAAGTG CTATACAAGG ATATTATGAA GCCGAGTGGC AAGTGAAGAA
651 TAAAGAAAAA TATGGAAATG GAGATATAGA AATAAGTGAT AACGCAAATG
701 TCACGAATAA TGAAAGGATA TTTCAAAAAG GAATACACAA TGATAATAAT
751 ATTAACAATA ATATTAATAA TAATAATTAT ATCAATCCTT CAGATGTGGT
801 AGGAAGAGAA AATACGAATG TACCAAATGT ACGAAATGAT AACCATAACG
851 TGGATAAAGT ACACATTGCT ATTATAGGAG ATGGTGGTTT AACAGGTGGA
901 ATGGCATTAG AAGCGTTAAA TTATATTTCA TTCTTGAATT CTAAAATTTT
951 AATTATTTAT AATGATAACG GACAAGTTTC TTTACCAACA AATGCCGTAA
1001 GTATATCAGG TAATAGACCT ATAGGTTCTA TATCAGATCA TTTACATTAT
1051 TTTGTTTCTA ATATAGAAGC AAATGCTGGT GATAATAAAT TATCGAAAAA
1101 TGCAAAAGAG AATAACATTT TTGAAAATTT GAATTATGAT TATATTGGTG
1151 TTGTGAATGG TAATAATACA GAAGAGCTCT TTAAAGTATT AAATAATATA
1201 AAAGAAAAA AATTAAAAAG AGCTACTGTT CTTCATGTAC GTACAAAAA
1251 ATCGAATGAT TTTATAAATT CAAAGAGTCC AATAAGTATA TTGCACTCTA
1301 TAAAGAAAAA TGAGATTTTC CCGTTCGATA CCACTATATT AAATGGAAAT
1351 ATTCATAAGG AGAACAAGAT AGAAGAAGAG AAAAATGTGT CTTCATCTAC
1401 AAAGTATGAT GTAAATAATA AGAATAATAA AAATAATGAT AATAGTGAAA
1451 TTATAAAATA TGAAGATATG TTTTCAAAAG AGACGTTTAC AGATATATAT

Fig. 1b Teil 1

14 05.08.99

1501 ACAAATGAAA TGTTAAAATA TTTAAAGAAA GATAGAAATA TAATATTCCT
1551 ATCTCCCGCT ATGTTAGGAG GATCAGGATT GGTAAAAATT AGTGAGCGTT
1601 ATCCAAATAA TGTATATGAT GTAGGTATAG CAGAACAACA TTCTGTAAC
1651 TTCGCAGCAG CTATGGCAAT GAATAAGAAA TAAAAAATAC AATTATGTAT
1701 ATATTCGACC TTTTACAAA GAGCATATGA TCAAATTATA CATGATCTTA
1751 ATTTACAAAA TATACCTTTA AAGGTTATAA TTGGAAGAAG TGGATTAGTA
1801 GGAGAGGATG GGGCAACACA TCAAGGTATA TATGATTTAT CTTATCTTGG
1851 GACACTTAAC AATGCATATA TAATATCTCC AAGTAATCAA GTTGATTTGA
1901 AAAGAGCTCT TAGGTTTGCT TATTTAGATA AGGACCATTC TGTGTATATA
1951 CGTATACCCA GAATGAACAT ATTAAGTGAT AAGTACATGA AAGGATATTT
2001 GAACATTCAT ATGAAAAATG AGAGCAAAAA TATCGATGTA AACGTGGATA
2051 TAAACGATGA TGTAGATAAA TATAGTGAAG AATATATGGA CGATGATAAT
2101 TTTATAAAAT CGTTTATTGG AAAATCTAGA ATTATTAAAA TGGATAATGA
2151 AAATAATAAT ACAAATGAAC ATTATTCAAG CAGAGGAGAT ACACAGACAA
2201 AAAAAAAAAA AGTTTGTATC TTTAACATGG GTAGTATGCT TTTTAATGTA
2251 ATTAATGCTA TAAAAGAAAT TGAAAAAGAA CAATATATTT CACATAATTA
2301 TTCTTTTTCA ATTGTTGATA TGATATTTTT AAATCCTTTA GATAAAAATA
2351 TGATA

Fig. 1b Teil 2

M 05.08.99

```

10      30      50
ATGAAGAAATATATTTATATATATTTTTCTTCATCACAATAACTATTAATGATTAGTA
M K K Y I Y I Y F F F I T I T I N D L V

70      90      110
ATAAATAATACATCAAAATGTGTTTCCATTGAAAGAAGAAAAATAACGCATATATAAAT
I N N T S K C V S I E R R K N N A Y I N

130     150     170
TATGGTATAGGATATAATGGACCAGATAATAAAATAACAAAGAGTAGAAGATGTAAAAGA
Y G I G Y N G P D N K I T K S R R C K R

190     210     230
ATAAAGTTATGCAAAAAGGATTTAATAGATATTGGTGCAATAAAGAAACCAATTAATGTA
I K L C K K D L I D I G A I K K P I N V

250     270     290
GCAATTTTTGGAAGTACTGGTAGTATAGGTACGAATGCTTTAAATATAATAAGGGAGTGT
A I F G S T G S I G T N A L N I I R E C

310     330     350
AATAAAATTGAAAATGTTTTAATGTTAAAGCATTGTATGTGAATAAGAGTGTGAATGAA
N K I E N V F N V K A L Y V N K S V N E

370     390     410
TTATATGAACAAGCTAGAGAATTTTTACCAGAATATTTGTGTATACATGATAAAAGTGTA
L Y E Q A R E F L P E Y L C I H D K S V

430     450     470
TATGAAGAATTAAGAGTTGGTAAAAATATAAAAGATTATAAACCTATAATATTGTGT
Y E E L K E L V K N I K D Y K P I I L C

490     510     530
GGTGAGAAGGGAAAAGAAATATGTAGTAGTAATAGTATAGATAAAATAGTTATTGGTATT
G E K G K E I C S S N S I D K I V I G I

550     570     590
GATTCTTTTCAAGGATTATATTCTACTATGTATGCAATTATGAATAATAAAATAGTTGCG
D S F Q G L Y S T M Y A I M N N K I V A

610     630     650
TTAGCTAATAAAGAAATCCATTGTCTCTGCTGTTTCTTTTAAAGAAATTATTAAATATT
L A N K E S I V S A G F F L K K L L N I

670     690     710
CATAAAATGCAAAGATAATACCTGTTGATTTCAGAACATAGTGCTATATTTCAATGTTTA
H K N A K I I P V D S E H S A I F Q C L

730     750     770
GATAATAATAAGGTATTAAAAACAAAATGTTTACAAGACAATTTTTCTAAAATTAACAAT
D N N K V L K T K C L Q D N F S K I N N

790     810     830
ATAAATAAAATATTTTTATGTTTCATCTGGAGGTCCATTTCAAAATTTAACTATGGACGAA
I N K I F L C S S G G P F Q N L T M D E

850     870     890
TTAAAAATGTAACATCAGAAAATGCTTTAAAGCATCCTAAATGGAAAATGGGTAAGAAA
L K N V T S E N A L K H P K W K M G K K

```

Fig. 2a Teil 1

M 05.05.99

910 930 950
ATAACTATAGATTCTGCAACTATGATGAATAAAGGTTTAGAGGTTATAGAAACCCATTTT
I T I D S A T M M N K G L E V I E T H F

970 990 1010
TTATTTGATGTAGATTATAATGATATAGAAGTTATAGTACATAAAGAATGCATTATACAT
L F D V D Y N D I E V I V H K E C I I H

1030 1050 1070
TCTTGTGTTGAATTTATAGACAAATCAGTAATAAGTCAAATGTATTATCCAGATATGCAA
S C V E F I D K S V I S Q M Y Y P D M Q

1090 1110 1130
ATACCCATATTATATTCTTTAACATGGCCTGATAGAATAAAAAACAAATTTAAACCTTTA
I P I L Y S L T W P D R I K T N L K P L

1150 1170 1190
GATTTGGCTCAGGTTTCAACTCTTACATTTTCATAAACCTTCTTTAGAACATTTCCCGTGT
D L A Q V S T L T F H K P S L E H F P C

1210 1230 1250
ATTAATTTAGCTTATCAAGCAGGTATAAAAGGAACTTTTATCCAAGTGTACTAAATGCG
I K L A Y Q A G I K G N F Y P T V L N A

1270 1290 1310
TCAAATGAAATAGCTAACAACCTTATTTTTGAATAATAAAATTAATATTTTGATATTTCC
S N E I A N N L F L N N K I K Y F D I S

1330 1350 1370
TCTATAATATCGCAAGTTCTTGAATCTTTCAATTCTCAAAGGTTTCGGAAAATAGTGAA
S I I S Q V L E S F N S Q K V S E N S E

1390 1410 1430
GATTTAATGAAGCAAATTCTACAAATACATTCCTGGGCCAAAGATAAAGCTACCGATATA
D L M K Q I L Q I H S W A K D K A T D I

1450
TACAACAAACATAATTCTTCA
Y N K H N S S

Fig. 2a Teil 2

10 30 50
 GATGAAATATATAAAGAAATATATGAATAATATGTAGAAAGAAATATTCCTGAATATTAT
 D E I Y K E I Y E L Y V E R N I P E Y Y

70 90 110
 GAACGAAATATTTTTTCAGAAGATATTAAGAGTGTCTTATTTGATATAGATAAATAT
 E R K Y F S E D I K K S V L F D I D K Y

130 150 170
 AATGATGTCTGAATTTGAAAAAGCTATAAAGAAGAATTTATAAATAATGGAGTTTATATT
 N D V E F E K A I K E E F I N N G V Y I

190 210 230
 AATAATATAGATAATACATATTATAAAAAAGAAATATTTTAATAATGAAAAAGATATTA
 N N I D N T Y Y K K E N I L I M K K I L

250 270 290
 CATTATTTCCCATTTATAAATTAATAATCCATCAGATTTAAAAAAGTTAAAAAAA
 H Y F P L L K L I N N P S D L K K L K K

310 330 350
 CAATATTTACCTTTATTAGCACATGAATTAAAAATATTTTTATTTTTATTGTAAATATA
 Q Y L P L L A H E L K I F L F F I V N I

370 390 410
 ACAGGAGGTCAATTTTTCTCTGTTTTAAGCTCTTTAGAAATTCATTTATTATTATTGTAT
 T G G H F S S V L S S L E I Q L L L L Y

430 450 470
 ATTTTAAATCAACCATATGATAATGTTATATATGATATAGGACATCAAGCATATGTACAT
 I F N Q P Y D N V I Y D I G H Q A Y V H

490 510 530
 AAGATATTGACCGGAAGAAACTATTATTTCTATCATTAAAGAAATAAAAAAGGTATTAGT
 K I L T G R K L L F L S L R N K K G I S

550 570 590
 GGATTCCTAAATATTTTTGAAAGTATTTATGATAAATTTGGGGCTGGTCACAGTTCCACT
 G F L N I F E S I Y D K F G A G H S S T

610 630 650
 TCATTAAGTGCTATACAAGGATATTATGAAGCCGAGTGGCAAGTGAAGAATAAAGAAAAA
 S L S A I Q G Y Y E A E W Q V K N K E K

670 690 710
 TATGGAAATGGAGATATAGAAATAAGTGATAACGCAATGTACGAATAATGAAAGGATA
 Y G N G D I E I S D N A N V T N N E R I

730 750 770
 TTTCAAAAAGGAATACACAATGATAATAATATTAACAATAATATTAATAATAAATTAT
 F Q K G I H N D N N I N N N I N N N N Y

790 810 830
 ATCAATCCTTCAGATGTGGTAGGAAGAGAAAAATACGAATGTACCAATGTACGAAATGAT
 I N P S D V V G R E N T N V P N V R N D

850 870 890
 AACCATAACGTGGATAAAGTACACATTGCTATTATAGGAGATGGTGGTTTAAACAGGTGGA
 N H N V D K V H I A I I G D G G L T G G

Fig. 2b Teil 1

1105.06.99

910 930 950
 ATGGCATTAGAAAGCGTTAAATTATATTTCATTCTTGAATTCTAAAATTTTAATTATTTAT
 M A L E A L N Y I S F L N S K I L I I Y

970 1010
 AATGATAACGGACAAGTTTCTTTACCAACAAATGCCGTAAGTATATCAGGTAATAGACCT
 N D N G Q V S L P T N A V S I S G N R P

1030 1050 1070
 ATAGGTTCTATATCAGATCATTACATTATTTTGTCTTAATATAGAAGCAAATGCTGGT
 I G S I S D H L H Y F V S N I E A N A G

1090 1110 1130
 GATAATAAATTATCGAAAAATGCAAAGAGAATAACATTTTGAATTTGAATTATGAT
 D N K L S K N A K E N N I F E N L N Y D

1150 1170 1190
 TATATTGGTGTGTGAATGGTAATAACAGAAGAGCTCTTAAAGTATTAAATAATATA
 Y I G V V N G N N T E E L F K V L N N I

1210 1230 1250
 AAAGAAAATAAATTAAAAAGAGCTACTGTTCTTCATGTACGTACAAAAAATCGAATGAT
 K E N K L K R A T V L H V R T K K S N D

1270 1290 1310
 TTTATAAATTCAAAGAGTCCAATAAGTATATTGCACTCTATAAAGAAAAATGAGATTTTC
 F I N S K S P I S I L H S I K K N E I F

1330 1350 1370
 CCGTTCGATACCACTATATTAATGGAATATTCATAAGGAGAACAAGATAGAAGAAGAG
 P F D T T I L N G N I H K E N K I E E E

1390 1410 1430
 AAAAATGTGTCTTCATCTACAAAGTATGATGTAATAATAAGAATAATAAAAAATATGAT
 K N V S S S T K Y D V N N K N N K N N D

1450 1470 1490
 AATAGTGAAATTATAAAATATGAAGATATGTTTTCAAAGAGACGTTACAGATATATAT
 N S E I I K Y E D M F S K E T F T D I Y

1510 1530 1550
 ACAAATGAAATGTTAAATATTTAAAGAAAGATAGAAATATAATATTCCTATCTCCCGCT
 T N E M L K Y L K K D R N I I F L S P A

1570 1590 1610
 ATGTTAGGAGGATCAGGATTGGTTAAATTAGTGAGCGTTATCCAAATAATGTATATGAT
 M L G G S G L V K I S E R Y P N N V Y D

1630 1650 1670
 GTAGGTATAGCAGAACAACATTCTGTAACCTTCGCAGCAGCTATGGCAATGAATAAGAAA
 V G I A E Q H S V T F A A A M A M N K K

1690 1710 1730
 TTAAAAATACAATTATGTATATATTCGACCTTTTTACAAAGAGCATATGATCAAATTATA
 L K I Q L C I Y S T F L Q R A Y D Q I I

1750 1770 1790
 CATGATCTTAATTTACAAAATATACCTTTAAAGGTTATAATTGGAAGAAGTGGATTAGTA
 H D L N L Q N I P L K V I I G R S G L V

1810 1830 1850
 GGAGAGGATGGGGCAACACATCAAGGTATATGATTTATCTTATCTTGGGACACTTAAC
 G E D G A T H Q G I Y D L S Y L G T L N

M 05.08.99

1870 1890 1910
AATGCATATATAATATCTCCAAGTAATCAAGTTGATTTGAAAAGAGCTCTTAGGTTTGCT
N A Y I I S P S N Q V D L K R A L R F A
1930 1950 1970
TATTTAGATAAGGACCATTCTGTGTATATACGTATACCCAGAATGAACATATTAAGTGAT
Y L D K D H S V Y I R I P R M N I L S D

1990 2010 2030
AAGTACATGAAAGGATATTTGAACATTATGAAAAATGAGAGCAAAAATATCGATGTA
K Y M K G Y L N I H M K N E S K N I D V

2050 2070 2090
AACGTGGATATAAACGATGATGTAGATAAATATAGTGAAGAATATATGGACGATGATAAT
N V D I N D D V D K Y S E E Y M D D D N

2110 2130 2150
TTTATAAAATCGTTTATTGGAAAATCTAGAATTATTAAAATGGATAATGAAAATAATAAT
F I K S F I G K S R I I K M D N E N N N

2170 2190 2210
ACAAATGAACATTATTCAAGCAGAGGAGATACACAGACAAAAAAAAAAAAAGTTTGTATC
T N E H Y S S R G D T Q T K K K K V C I

2230 2250 2270
TTTAACATGGGTAGTATGCTTTTTAATGTAATTAATGCTATAAAAAGAAATTGAAAAAGAA
F N M G S M L F N V I N A I K E I E K E

2290 2310 2330
CAATATATTTACATAATTATTCTTTTTCAATTGTTGATATGATATTTTAAATCCTTTA
Q Y I S H N Y S F S I V D M I F L N P L

2350
GATAAAAATATGATA
D K N M I

Fig. 2b

Teil 3

M 05.05.99

1 MKKYIYIYFF FITITINDLV INNTSKCVSI ERRKNNAYIN YGIGYNGPDN
51 KITKSRRCKR IKLCKKDLID IGAIKKPINV AIFGSTGSIG TNALNIIREC
101 NKIENVFNVK ALYVNKSVNE LYEQAREFLP EYLCIHDKSV YEELKELVKN
151 IKDYKPIILC GEKGKEICSS NSIDKIVIGI DSFQGLYSTM YAIMNNKIVA
201 LANKESIVSA GFFLKLLNI HKNAKIIPVD SEHSAIFQCL DNNKVLKTKC
251 LQDNFSKINN INKIFLCSSG GPFQNLTMDE LKNVTSENAL KHPKWKMGKK
301 ITIDSATMMN KGLEVIETHF LFDVDYNDIE VIVHKECIIH SCVEFIDKSV
351 ISQMYYPDMQ IPILYSLTWP DRIKTNLKPL DLAQVSTLTF HKPSLEHFPC
401 IKLAYQAGIK GNFYPTVLNA SNEIANNLFL NNKIKYFDIS SIISQVLESF
451 NSQKVSENSE DLMKQILQIH SWAKDKATDI YNKHNS

Fig. 3a

11 05 08 99

1 DEIYKEIYEL YVERNIPEYY ERKYFSEDIK KSVLFDIDKY NDVEFEKAIAK
51 EEFINNGVYI NNIDNTYYKK ENILIMKKIL HYFPLLKLIN NPSDLKKLKK
101 QYLPLLAHEL KIFLFFIVNI TGGHFSSVLS SLEIQLLLLY IFNQPYDNVI
151 YDIGHQAYVH KILTGRKLLF LSLRNKKGIS GFLNIFESYI DKFGAGHSST
201 SLSAIQGYE AEWQVKNEK YGNGDIEISD NANVTNNERI FQKGIHNDNN
251 INNNINNNNY INPSDVVGRE NTNVPNVRND NHNVDKVHIA IIGDGGLTGG
301 MALEALNYIS FLNSKILIIY NDNGQVSLPT NAVSISGNRP IGSISDHLHY
351 FVSNIEANAG DNKLSKNAKE NNIFENLNYD YIGVVNGNNT EELFKVLNNI
401 KENKLKRAV LHVRTKKSND FINSKSPISI LHSIKKNEIF PFDTTILNGN
451 IHKENKIEEE KNVSSSTKYD VNNKNNKNND NSEIIKYEDM FSKETFTDIY
501 TNEMLKYLKK DRNIIFLSPA MLGGSGLVKI SERYPNVYD VGIAEQHSVT
551 FAAAMAMNKK LKIQLCIYST FLQRAYDQII HDLNLQNIPL KVIIGRSGLV
601 GEDGATHQGI YDLSYLGTLN NAYIISPSNQ VDLKRALRFA YLDKDHVSYY
651 RIPRMNILSD KYMKGYNLNIH MKNESKNIDV NVDINDDDVK YSEEYMDDDN
701 FIKSFIGKSR IIKMDNENNN TNEHYSSRGD TQTKKKKVC I FNMGSMLFNV
751 INAIKEIEKE QYISHNYSFS IVDMIFLNPL DKNMI

Fig. 3b

11.05.08.99

```

HpyI -----
Aaeo -----
Mtub -----MATGGRVVIRRRGNEVVAH-----NDEVNTSTD-----GRADGLRV
Bsub -----
Syne -----
Paer -----MSRPOPI
Hinf -----
Ecol -----
Pfal MKKYIIYFFFITITINDLVINNTSKCVSIERRKNNAYINYGIGYNGPDNKITKSRRCKRIKLCCKDLIDIGAIKKPINV

```

```

HpyI VVLSSTGSGIGKNAEGLAKKFG-----IEIEALSCGKN-TALINEGIQVSPKVAHLDPSDLND-EPL-----GAEVF
Aaeo GVLSTGSGVGSQTLQVYEN---FRDEIELVGLANRAS-ENLQQAQKYNKPKYVVSIOEPAKEN-ESLFEQVKYLK-----
Mtub VVLSSTGSGIGKQALQVIADN---PDRFEVVGLAAGGAHLDTLRQRAQTGVNTIAVADEHAAQVGDIPYH-----
Bsub CGLSATGSGIGKQTLQVIRAH---QDQEQLVSMSEGRN-TOKAVEMIEVEQPKFVSVGLDITYHK-KOMS---FSFEQCIQ
Syne SILGSGSGIGKQTLQVITHH---PDAEQVVGLAAGGN-VALLAQQVAEERPEIVAIHQAEKLEDEKAVAELTDYQPMV
Paer SVLGATGSGIGLSTLDVVRH---PDRYEAFALTGFSR-LAEDEALCLRHRPVYAVVPEQAAALAQSLAAAGIRKTVL
Hinf VILGSGSGIGKSTLSVIENN---PKYHAFALVGGKN-VEAMFEQCINRPHFAALDDVNAAKIRKELIAH-HIPTFVL
Ecol TILGSGSGIGKSTLDVVRH---PEHERVVALVAGKN-VTRAVEOCLESPRYAVMDDEASAKILKMLQQQ-GSRTEVL
Pfal AILGSGSGIGKNAEGLAKKFG-----IEIEALSCGKN-TALINEGIQVSPKVAHLDPSDLND-EPL-----GAEVF

```

```

HpyI VGLGECIDAMIEECTSNLVLVAIVGVAGLKASFSKSLORNNALANKESLVSAGELL-----DISCIPIDSEHGLWA
Aaeo -GDEGLKAIIE---ESERLMAISGIYGIKPAYEVIRKAGKTLASNKESILCLCEIIR-----KRRERVIPVDSEHGLWA
Mtub -GSDAATRLVEQTEADVVLNALVGCALGRPTLAALKTGARIALANKESLVSAGGSVLVRAARPG---QIVPVDSEHGLWA
Bsub LCEGLIEAAVMEVDIVVALLGSLVGLIPTLAIEQKRTIALANKETLVTAQHIVKBAK-KYDVLLPVDSEHGLWA
Syne VGLGCVVEVARYGDAESVVTGIVGCAGLLPTMAAIAAGKOTIALANKETLIAGAPVVLPLVE-KMGVLLPVDSEHGLWA
Paer FGLGALCEVASAFVDMVMAIVGAAGLPSTLAAVEAGKRVLLANKESLVSAGGLFMQAVK-RSGAVLLPVDSEHGLWA
Hinf AGRAICEIAAHPDADQIMASIVGAAGLLPTLSAVKAGKRVLLANKESLVTCCGLFIDAVK-NYGSLLPVDSEHGLWA
Ecol SGQQAACDMALEDVDQVMAIVGAAGLLPTLAIRAGKRVLLANKESLVTCCGLFIDAVK-QSKACLLPVDSEHGLWA
Pfal CGLGK-KELCSSNSIDNIVIGISDFQGLYSITMAIMNKIVALLANKESLVSAGFFLKILLNIEHNAKIPVDSEHGLWA

```

```

HpyI LDKNTLKP-----KSLIITASGGAFFROTHLEETIPIONAQNALKHPNWSMGSKITISASMVNKLFEILET
Aaeo LSSV-----KREEVKHVYLTASGGFFKOKSLEELKKTASVEEALRHPNWSMGKAKITISATMMNKGLEVIET
Mtub CDRGGTP-----DEVAKLVLITASGGFFRGSAAADLEEVTPQACAHPTWSMGPMNTLNEASLVNKGLEVIET
Bsub AE-----QGEQAKN-IERLIITASGGSFROKTFREELESVTEQALKHPNWSMGKAKITISATMMNKGLEVIET
Syne CE-----QGVPEGG-LRRILLITASGGAFFROLFVERLPFVTQDALKHPNWSMGKAKITISATMMNKGLEVIET
Paer SLPR-----NYADGLERVG-VRRILLITASGGFFRETFLEQLASVTEQACAHPTWSMGKAKISVTSATMMNKGLEVIET
Hinf SLPP-EAQEKIGFCP-LSELG-VSKILLTGSGGGFFRYTFLEQFTNITPEQAVAHPTWSMGKAKISVTSATMMNKGLEVIET
Ecol SLPP-PIQHNLGAD-LEQNG-VVSILLTGSGGGFFRETFLEQFTNITPEQACAHPTWSMGKAKISVTSATMMNKGLEVIET
Pfal CLDMNKVLKTKCLQDNFSKINNINKIFLCSSGGFFQNLTMDELKNTSENALKHPNWSMGKAKITISATMMNKGLEVIET

```

```

HpyI YWLFEGASL-KIDALIERSSIVHALVEEDNSIIAHASADMOLPISYADPKLASLSASIKPLDYALSATKEPISMER
Aaeo HELFDFPIENIKVVIHPOSEVHGILELIDNSELMTSQTDMKIPIHMAFYPRKKEYP-FKKVSLLELSPITEKVEITTK
Mtub HILFGIPYDRIDVVVHPOSIHSMVTEIDGSTIAQASFPDMKLPISALGWPRRVSGAAAA-CDFHTASSWSEPIETDV
Bsub HWLFIDIPYEQIDVVLHPOSIHSMVTEIDGSTIAQASFPDMRVPIQYALTYPDRLPLPDAKREBELNIGSLTEPEKAEFDR
Syne HYLFGLDYDEHIDIVIHPOSIHSLIEVDTSVLAQLGCPDMRLPLDYALSWPERI-YTDWEPLDLVKGSLSEPELHDK
Paer CWFDAQPSQVEVVIHPOSVIHSMDVYVDCSVIAQLGCPDMRTPISYAMWPERID-SGVSPDMTAVGRLEQREDFOR
Hinf RWLFNASAEEMEVIIHPOSVIHSMDVYVDCSVITQMGCPDMRTPIAETMAYPERTF-AGVEPLDFKIKELTETIEEDFNR
Ecol RWLFNASASQMEVLIHPOSVIHSMDVYVDCSVLAQLGCPDMRTPIAETMAYPVRN-SGVKPLDFCKLSALTFAAPYDR
Pfal HELFDVDYNDIEVIVHKECLIHSGVEIDKSVISQATYPDMDIPIILYSITWPDRIK-TNLKPLDLAQVSTLTFHKPSLEH

```

Fig. 4a Teil 1

17.05.08.99

```

HpyI  YTLWCYKDLLENPKLC---VVLNASNEVAMERFLNKEIAEGGLIQTTISQALESYDKMPFLLSSLE---EVLELDKEVR
Aaeo  EK--AID-LAKWAGFMGGVYIPVLVGADEEAVNLEFNKRIGELDIVDITEQALS-----EVNIKDPQSVEEILEAVEWGR
Mtub  EP--AVE-LARQAGVAGGCMATAVYNAANEAAAAFLAGRIGEPATVGHADVLHAADQWAVEPATVD---DVLDAQRWAR
Bsub  ER--CLO-FAFESGKIGGTIMPTVLNAANEVAVAAFLAGKIFELATEDCHEKA---LTRHQLLKPSWR---TF---KRWTK
Syne  YP--CMQ-LAYCAGRAGGAMPVAVLNAANECAVALEFLOEKISELDIPRLIEKTCDLVVGONTASPDLE---TILAADQWAR
Paer  EP--CLR-LASQAAETGGSAPAMLNAANEVAVAAFLERHIRESDIAVILIEDV---LNREAVTAVESLD---QVLAADRRAR
Hinf  YP--NIK-LAIDAFAGQYATTAMNAANEIAVQAFIDROIGEMDIARTNSKT---IERISPYTIQNIID---DVLEIDACAR
Ecol  YP--CLK-LAMEAFEGGQAATTALNAANEITVAAFIAQQIRFTDIAALNLSV---LEKMDMREPCVD---DVLSDANAR
Pfal  EP--CLK-LAYCAGIRCNFYPTVLNASNEIANNLEFNKRIGELDIVDITEQALS-----EVLELDKEVR

```

```

HpyI  ERFKNVAGV-----
Aaeo  QKVREIYERKYAGKG-----
Mtub  ERAQRAVSGMASVAIASTAKPGAAGRHAATLERS
Bsub  IPGDTSIQYSHKVVCS-----
Syne  ---RTVLENSACVATRP-----
Paer  SVAGQWLTRHAG-----
Hinf  EIA-KTLLRE-----
Ecol  EVARKEVMRLAS-----
Pfal  DKATDIYNKHNS-----

```

Fig. 4a

Teil 2

11.05.08.99

```
Pfal -----
Hpyl -----
Mtub -----
Bsub -----
Syne -----
Paer -----
Ecol -----
Hinf -----
Rcap -----
Osat -----
Atha MASSAFAPPSYIIITKGLSTDCKSTSLSSRSLVTDLPSPCLK-----PNNNSHSNRRRAKVCASLAEK
Mpip MASSCGVIKSSFLP-----SLHSEDSTFLSRAP---TSLFLKNHKLNVVAALQODSSNDVVPSCDRLSRPKSR---ALSFT
```

```
Pfal -----DIKKLKKQYLPPLAELKIFLFFIVNTTGGHFSSVSSLEIQLLYIENQYIENVIYD
Hpyl -----MILQNKTFDINPNDIAGLELVQQLRNRRIIEVVSANGGHLSSSLGAVEIIVGMEALFDCQKNPTIFD
Mtub -----MLQQIRGPADLOHLSQAQLRELAAREIFLIHVAATGGHLLGPNLEVVVELTALHVFDSPEELIIFD
Bsub -----MDLLSIQDPSEIKNMSIDELERISDEIROFLITSLSASGCHIGPNLEVVVELTVALEHLENSPCKQLWD
Syne -----MHISELTHPELKLGLSIRELEEVSRQIREKELQVATSGGHLGPGLEVVVELTVALYSTLDLDKERVWD
Paer LHEIPRERPATPFLDRASSPAELRRIGEADELTLADELRQYLLYTVQCTGGHFGAGLEVVVELTIALHIVEDTPQRLVWD
Ecol ---MSFDIAKYPTLALVDSTQELRLLPKESLPKLCDELRRYLLDSVSRSSGHHFASGLEVVVELTVALHIVYNTPEQLIWD
Hinf ---MTNNMNNYPLLSLINSPELRLANKDQLPQLCELRAYLLESVSQTSGHLASGLEVVVELTVALHIVYNTPEQLIWD
Rcap ---MSATPSRTPELDRVTGPADLRAMSIALDALASEVVRREIVEVVSQCTGGHLLGSSLEVVVELTVALHIVNSPCKQLIWD
Osat -----NYPIMKNLSLKLQQLADELRSDVIFVSKTGGHLLGSSLEVVVELTVALHIVNTPEQLIWD
Atha GEYYSNRPP-TPLLOTINYPIMKNLSVKELKQLSDELRSDVIFVSKTGGHLLGSSLEVVVELTVALHIVNTPEQLIWD
Mpip GE-----KPP-IPILDTINYPIMKNLSVEELANLADELREEIVYTVSKTGGHLLSSSLGVVELTVALHIVNTPEQLIWD
```

```
Pfal IGHQAVVHKILTGRKLLFLSLRNKNGISGFLNIFESIYDKFGAGHSSTLSAICGYEAEWQVKNKEKYNGDIEISDNA
Hpyl TSHQAVVHKLLTGRFESFSTLROFNGLSGFTKPSSEAYDYFLAGHSSTSVSIGVGVAF
Mtub TGHQAVVHKMLTGRSQDFATLRKKGGLSGYPSRAESEHDVWESSHASAALSADGLAF
Bsub VGHQAVVHKLLTGRGKEFATLRQYNGLCGFPKRSESEHDVWETCHSSTLSGAMGMAAR
Syne VGHQAVVHKMLTGRYEDFETLRQKDGAGYLKRSESRDEHFGAGHASTSISAGLGMAAR
Paer VGHQAVVHKILTGRRELMCTLRQKNGDAAPPRASEYDTFGVGHSSSTISAAALGMAIAR
Ecol VGHQAVVHKILTGRDKIGTIROKGGHFFPWRSESEYDVLVGHSSSTISAGIGIAVAA
Hinf VGHQAVVHKILTGRRECMSTIROKDGIEHFFPWRSESEYDVLVGHSSSTISAGIGIAVAA
Rcap VGHQAVVHKILTGRRSRMLTLROAGGISGFPKRSESPHDAFGAGHSSTISAAALGMAVGR
Osat VGHQAVVHKILTGRRDKMETMROINGLSGFTKRSESEYDSFGTGHSSSTISAAALGMAVGR
Atha VGHQAVVHKILTGRRGKMETMROINGLSGFTKRSESEHDCFGTGHSSSTISAGLGMAVGR
Mpip VGHQAVVHKILTGRRARMETIROTEGLAGEPKRDESAHDAFGAGHSSTISAGLGMAVAR
```

```
Pfal NVTNNERIFQKGIHNDNNNNNNNNNNYINPSDVVGRENTNVPNVRNDNHNVDKVBIAIIGDGGLTGGMALALNIIISFL
Hpyl -----CLKQALGMP-----IALLGDCSISAGIFTEALNELCD-
Mtub -----ELTGHRRNHV-----VAVVGDGALTGGMCAEALNNIAA-
Bsub -----DIKGT-DEYI-----IPIIGDGALTGGMALALNHEICD-
Syne -----DAKGE-DFKV-----VSIIGDGALTGGMALALNHEACHL
Paer -----RLQCK-ERKS-----VAVIGDGALTAGMAFEALNHEASEV
Ecol -----EKEGK-NRRT-----VCVIGDGAITAGMAFEAMNHEAGDI
Hinf -----ERENA-GRKT-----VCVIGDGAITAGMAFEALNHEAGAL
Rcap -----ELCQP-VGDT-----IAIIGDCSITAGMAFEALNHEACHL
Osat -----DLKGG-KNNV-----VAVIGDGAMTAGMAFEAMNNAAGYL
Atha -----DLKGG-KNNV-----VAVIGDGAMTAGMAFEAMNNAAGYL
Mpip -----DLQK-NNHV-----ISVIGDGAMTAGMAFEALNNAAGFL
```

Fig. 4b Teil 1

11 05 05 00

Pfal NSK-ILITNDNGQVSLPTNAVSISGNRPICSTSDHLYFVSNTEANAGDNKISRNAKE-----
Hpyl RKYPMIMILNDN-EMSI-----STPICALSKAL-----SOLMKGPFYQSFERSKVKILSTPE---SVNYLASSEEE
Mtab SRRPVIVVNDNGR-----SYAPTICGVADHL-----ATURLQPAYEQALETGRDLVRAVPLVGGGLWFRFLHSVKA
Bsub EKMDMIVILNDN-EMSI-----APNVGATHSML-----GRLRACKYQWVKDELEYLFKKIPAVGGKLAATAEEVKD
Syne PHTRLMVLINDN-EMSI-----SPNVGALSRYL-----NRVRLSSPMQFLTDNLEEQIKHLPFVGDSLTPEMERVKE
Paer DA-DMLVILNDN-DMST-----SHNVGGLSNYL-----AKILSSRTYSSMREGSKKVLRLP---GAWZLARRTEE
Ecol RP-DMLVILNDN-EMSI-----SENVGALNNHL-----AQLLSGKLYSSSLREGGKRVFSGVP---PIKELLARTEE
Hinf HT-DMLVILNDN-EMSI-----SENVGALNNHL-----ARIFSGSLYSTLRDGSKKILDKVP---PIKNFMKITEE
Rcap KS-RMEVILNDN-DMST-----APEVGALQHYL-----NTIARQAPFAALKAAAEGETHEMLP---GPVRDGAARRARQ
Osat DS-DMIVILNDNKQVSLPTATLD-GPAPPVGAISSAL-----SKIQSSRPLRELDREVAKGVTQKIG---GSVHELAAKVDE
Atha DS-DMIVILNDNKQVSLPTATLD-GPSPVVGALISSAL-----SRIQSNPALRELDREVAKGVTQKIG---GPMHQLAAKVVDV
Mpip DS-NLIIVLNDNKQVSLPTATVD-GPAPPVGAISSAL-----TKIQASRKFRQUREAAKSMTKQIG---APAHEIASLTLQ

Pfal -----NNIFENLYDYIGVVGNGNTEELFKVNNNIKENKLRATVILHVRTRKSNDFINSKSPISILHSIKKNEIF
Hpyl SFR---LITPGVFEEELGINYIGPINGHOLSATIEETKLAKELKE---PVLIIHACITUK
Mtab GIKOSLSPO---LLFTDLGLKYVGPVDGHERAVEVALRSAR---RFGAPVIVHVVTBK
Bsub SLKMYLVS---GMFEELGCTYLGPDVGHSYHELIEHQYAK---KTKGEVLLHVITTK
Syne GKRLVVPKVGAVLEELGCFYEGPIDGHSLOELIDTFKQAE---KVEGPFVHVHSTTK
Paer YAKG-MLVP-GTLFEELGWNYYIGPIDGHDLPVLVATRNMRDMK---GPOFLHVVTBK
Ecol HIKG-MVVP-GTLFEELGFNYIGPDVGHDVLGLITTNKMRDLK---GPOFLHIVTKK
Hinf HMKGMFSPSTLFEELGFNYIGPDVGHNIDELVATLNMRNLK---GPOFLHIVTKK
Rcap MVTAMPG---GATLFEELGFDYIGPDVGHDMAELVETLR-VTRARASGPVLIHVCTTK
Osat YARGMISGSGSTLFEELGLYYIGPDVGHNIDDLITLREVKSTKTTGPVLIHVVTBK
Atha YARGMISGTGSSLFEELGLYYIGPDVGHNIDDLVATLREVKSTRTTGPVLIHVVTBK
Mpip YVKGMMGKPGASLFEELGIYYIGPDVGHNVEDLVYIFKKVKEMPAPGPVLIHITTK

Pfal PFDTTILNGNIHKNKIEEEKNVSSSTKYDVNNKNNKNDNSEIKYEDMFSKETETDIYTNEMLKYLKNDNIIELSPA
Hpyl -----GKGYKTAE---GRYEKWHGVGPFDDLTG---LSKKSXSAI-----LSPTEAYSNTLLELAKNDEKIVGVTA
Mtab -----CMGYPPAEADQAEQMHSTVPIIDPTGQA---TKVAG-----PGWTATSDALIGYAKRRDIVAITAA
Bsub -----GKGYKPAETDTTIGTWGCTGPKINTG---FVKPKAAA-----PSWSGLVSGTVORMAREDCRIVAITPA
Syne -----GKGYDIAEKDQVG---YHAQSPENLSTCKAYPSSKPKP-----PSYSKVSAETLITLAKENPNIVGITAA
Paer -----GN---APAEILDPIG---YHATITKLE---APGSAP---KKTGG-----PRYSVSFGQWLCDMAQDARLLGITPA
Ecol -----CRGYEPAEKDPIT---FHAVPKFDPSSGCLP---KSSGGL-----PSYSKIEGDWLCEAARDNKLMAITPA
Hinf -----GKGYAPAEKDPIG---FHGVPKFDPISGCLP---KNNSK-----PTYSKIEGDWLCEAERDAKIIGITPA
Rcap -----GKGYAPAEGAEDK---LHGVSKFDIETGKQK---KSIPNA-----PNYTAVEGERLTEEAARDQAIIVAVTAA
Osat -----CRGYPYAERAADK---YHGVAKFDPATCKQF---KSPART-----LSVTNYFAEALIAEAEQDNRVVAIHAA
Atha -----CRGYPYAERADDK---YHGVVKFDPATCKQF---KTTNET-----QSYTTYFAEALVAEAEVDKDVVAIHAA
Mpip -----GKGYPPAEIAADK---MHGVVKFDAKTCKOM---KTKNKT-----KSYTOYFAESLVAEAEEDDKIVAHAA

Pfal MLGSSGLVKISERYENNVYDVGIAEQHSVTEAAMAMNKKLKIQLCIYSTFLQRAYDQIIHDLNLQNIPLKVIIIGRSGLV
Hpyl MPSTGTGLDKLIDAYPLRFFDVATAEQHALTSSSAMAKEG---EKPEFSIYSTFLQRAYDSIVHDACISSLPKLAIDRAGIV
Mtab MPGTGLTAFGQRFEDRLFDVGIAEQHMTSAAGLMACG---LHPVVAIYSTFLNRAFQIMDVALHKLPMVMTDRAGIT
Bsub MPVGSRLGEGFAKEFPDRMFDVGIAEQHAATMAAAMAMQG---MKPELAIYSTFLQRAYDQVVDICRONANVEFIGIDRAGLV
Syne MATGTGLDKLOAKLPKQYVDVGIAEQHAVTIAAGMACG---IRPVVAIYSTFLQRGYDQIIHVDVCTOKLPVFFCLDRAGIV
Paer MKEGSLLVAFSERYPERYFDVATAEQHAVTIAAGMACG---MKPVVAIYSTFLQRAYDQLIHDVAVQHLVILFAIDRAGLV
Ecol MREGSGMVFEFSRRFPDRYFDVATAEQHAVTEAAGLAICG---YKPEVVAIYSTFLQRAYDQVLHDVAIQNLVILFAIDRAGIV
Hinf MREGSGMVFEFSRFPKQYFDVATAEQHAVTEAAGLAICG---YKPEVVAIYSTFLQRAYDQLIHDVAIQNLVILFAIDRAGIV
Rcap MPTGTGLDIMQKRFPRRVFDVGIAEQHAVTEAAGMAAAG---LKPEFALYSSSFQRGYDQVLHDVAILQNLVILFAIDRAGLV
Osat MGGGTGLNLYFLRRFPNRCFDVGIAEQHAVTEAAGLACEG---LKPEFCAIYSSSFQRGYDQVVDVLDQQLPVRFAMDRAGLV
Atha MGGGTGLNLFQRFPNRCFDVGIAEQHAVTEAAGLACEG---LKPEFCAIYSSSFQRAYDQVVDVLDQQLPVRFAMDRAGLV
Mpip MGGGTGLNIFQKQFDRCFDVGIAEQHAVTEAAGMAAAG---LKPEFCAIYSSSFQRGYDQVVDVLDQQLPVRFAMDRAGVV

Pfal GEDGATHQGIYDLSYLGTLNNAYLISPSNQVILKRALRFAYLKDHSVYIRIPRNNILSDKYMKGYLNIHMKNESKNIDV
Hpyl GEDGETHOGGLDVSYLRSIPNVVIFAPRDNETLKNAVRFANEHDSSEPCARYPR-----
Mtab GEDGATHQAFDLSMLGIVEGIRVAAPROATRLREZIEGALDVEDDGPALRFPK-----
Bsub GADGETHOGVFDIAEMRHIENVMIMPKDENEGQHMVHTALSVDCEGPIAMRFPR-----
Syne GADGETHOGMYDIAYLRCPNVLVMAPKDEAELOQMLVTCVNYTGGAIAMRYPR-----
Paer GEDGETHAGSFDISYLRCIPGLVMTSPSDEEDILRLITTYGLF---DGPAAVRYPR-----
Ecol GADGETHOGAFDLSYLRCIPENVMIMTPSDENECROMLYTEGYHYNDGPSAVRYPR-----
Hinf GADGATHQAFDISEMRCPNVMIMTPSDENECROMLYTEGYCGK---PAAVRYPR-----
Rcap GEDGATHAGAFDVSMLANLPNETVMAAADAEELCHMVVTAHAHDSGPALRYPR-----
Osat GADGETHCCAFDVTYMACLPNVVVMAPSDEAEELCHMVATAAIDDRPSCRYPR-----
Atha GADGETHCCAFDVTFMACLPNMVVMAPSDEAEELNMVATVAIDDRPSCRYPR-----
Mpip GADGETHCCAFDTTYMACLPNMVVMAPSDEAEELNMVATVAIDDRPSCRYPR-----

11 05 08 99

```
Pfal NVDINDVDKRYSEETMODDNFIKSFICKSRIRKMDNENNNNTNEHYSSRGDTQTKKKKVCIFNMESMIFNVINAIRKIEKE
Hpyl ----GSFALKEGVFEPSGFV----LGQSEILKKEG-----EHLILGYENGVCRAHLVQLALKEK
Mtab ----CD-V----CEDISALERRGCVDLAAPADGLNH-----DVLIVAITAFAPMAIAVAKRLBNQ
Bsub ----CNGI----GVK-MDE-QLKTIPIGTWVLRPGN-----DAVILTEGTTIDQATAAKELQKE
Syne ----CNGI----GVPLMEE-GWEFDEICKAEILRSGD-----DVLILGYCSAVYPALQTAELLHEH
Paer ----CSGP----NHPIDPDLQ--PVEIGKGVVRRRG-----RVAILVEGVQDAAMKVA-----E
Ecol ----CNAV----GVLTLP-LE--KUPICKGIVKRRGE-----KIAHINFGTTMPFAAKVA-----E
Hinf ----CNAV----GVLTLP-LE--MIPICKSRIRKQG-----KIAHINFGTTLPFAKELS-----E
Rcap ----CEGR----GVEMP--ERGEVIEIGKGRVMTGT-----EVALISFCABIAQALKAAMLEAE
Osat ----CNGI----GVPLPPNYKGVPLEVCKGRVLLGE-----RVAILGYCSAVQYCLAAASIVERH
Atha ----CNGI----GVALLPPGKGVPLEIGKGRVLLKEG-----RVAILGYCSAVQSCIGAAVMLEER
Mpip ----CNGI----GVALLPSNNKGTPLIEIGKGRVLLKEG-----RVAILGFGTTIVONCMAAANLLEQH
```

```
Pfal QYISHNYSFSIVDMIFLNPIDRMI-----
Hpyl ----NIECAULDLRFLKPLDENI--SAIVAPYQKLYVFSINYKLGGVASAILEFISEQNILK---FVKSFETIIDEFIMHG
Mtab ----GIGVIVIDPRWVLPVSDG--VRELAHQKLLVLTLEDNGVNGGAGSAVSAALR---RAEIDVPCRDVGLPOEFTYHA
Bsub ----GISVRYVNAFVKPIDERMMKSLKEGLPILITIEEAVIEGGFCSSILEFAHQGEYH--TPIDRMGIPDRFIEHG
Syne ----GIEATVNNARFVKPLDTELILPLAERIGKVVMTTEEGLMGGFCSAVAEALMDNN-VL--VPLKRLGVPDILVDHA
Paer ----SLDNTVVDMRVFKPLDEALVREIAGSHELLVITEENAVGGAGSAVGEFLASEGL---EVPLLQLGLPDYFVEHA
Ecol ----SLDNTVVDMRVFKPLDEALILEAASHEALVTVEENAIMGGAGSGVNEVLMHRK---FVPEVLNIGLPDFFIPOG
Hinf ----KLNATVVDMRVFKPIDIEMINVLAQTHDYLVLTLEENATGGAGSAVAEVLNSSGK---STALLQLGLPDYFIPOA
Rcap ----GVSTVVDARFCRPLDIDLIDRIEGHAALITLQOGAM--GGFCAMVLHYIARTGQLEKGRAIRTMTPDCYIDEG
Osat ----GLKVTVDARFCRPLDQTLIRRIASSHEVILLITVEEGSI--GGFCSHVAQFVALDGLLDGKLKWRP-----
Atha ----GLNVTVDARFCRPLDRALIRSIKASHEVILLITVEEGSI--GGFCSHVVQFVALDGLLDGKLKWRPMPVLPDRIIDEG
Mpip ----GISVTVADARFCRPLDGLIKKIVQEHVILLITVEEGSI--GGFSAHISHFUSLNGLLDGNLKWRPMPVLPDRIIDEG
```

```
Pfal -----
Hpyl NTALVEKSIGLDTESTDAILKDLGQER-----
Mtab SRSEVLADIGLTDQDVARRITGWVAALGTGVCASDAIPEHLD
Bsub SVTALLEEIGLTKQOVANRIRL-LMPPKTHKGIGS-----
Syne TPEQSTVDIGLTPAQVAQNIMASLFKTETESVVPAGVS----
Paer KPSEMLAECGLDAAGIEKAVRQRLDRQ-----
Ecol TQEEMLAEIGLDAAGIEAKIKAWLA-----
Hinf TQEEALADIGLDTKGIEEKILNFIKQGNL-----
Rcap SPEEMYAWAGITANDIRDTALA-AARPSKSVRIVHSA-----
Osat -----
Atha APADQLAEAGLMPSEHAATALNLIGAPREALF-----
Mpip AQSDQIEEAGLSFKHIACTVVSIGGGKDSLHLINNL-----
```

Fig. 4b

Teil 3

14.05.08.99

Dosis [mg/kg]	Parasitemie [%]	
	Formyl	Acetyl
300	0.0	0.0
30	0.0	0.0
10	0.0	0.0
5	0.06 ± 0.17	0.0
2	11.7 ± 16.5	0.86 ± 0.44
Kontrolle	65.9 ± 19.1	65.9 ± 19.1

Fig. 5

M 05.08.99

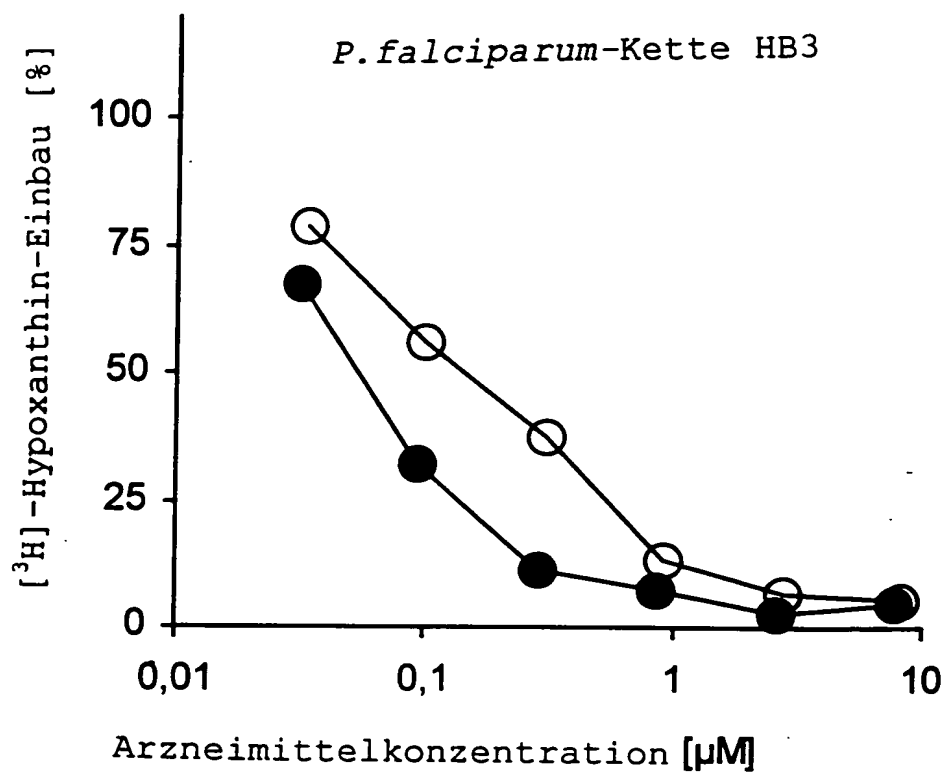


Fig. 6a

11 05.08.99

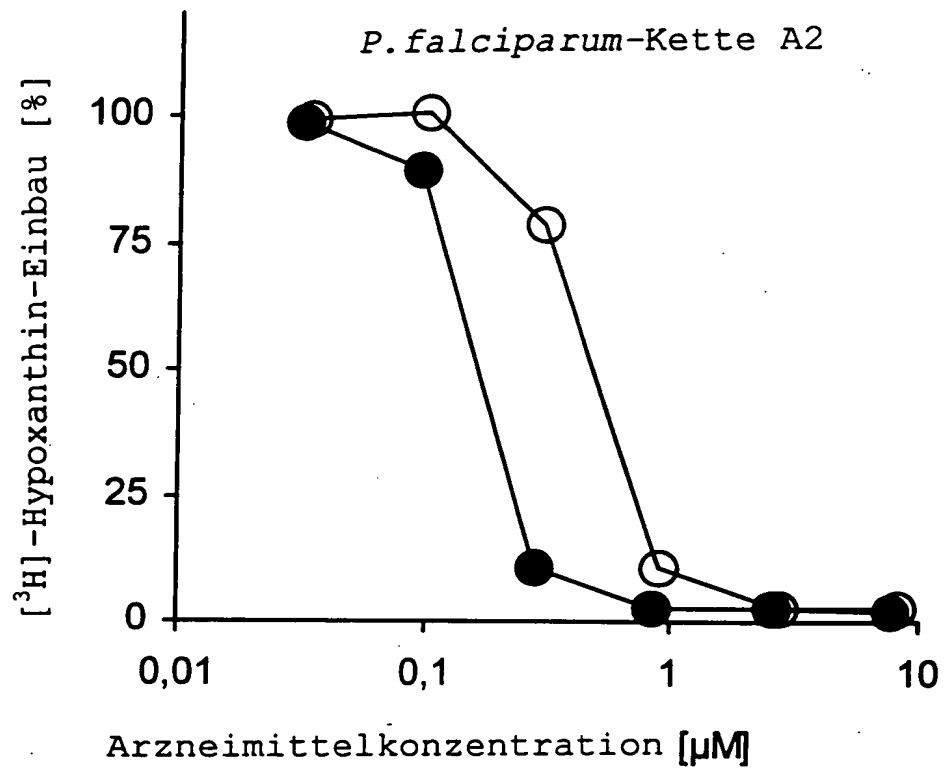


Fig. 6b

11.05.08.99

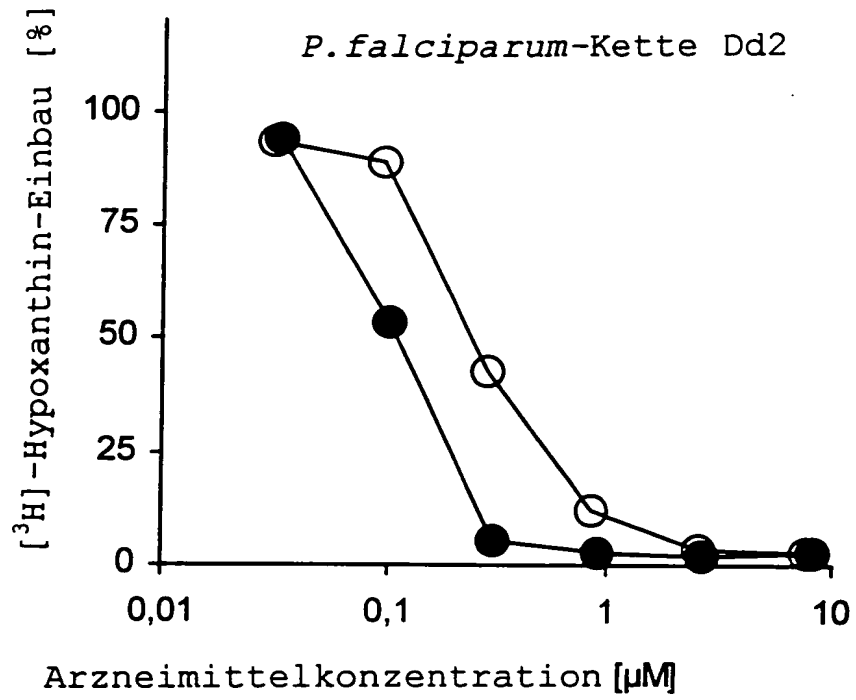
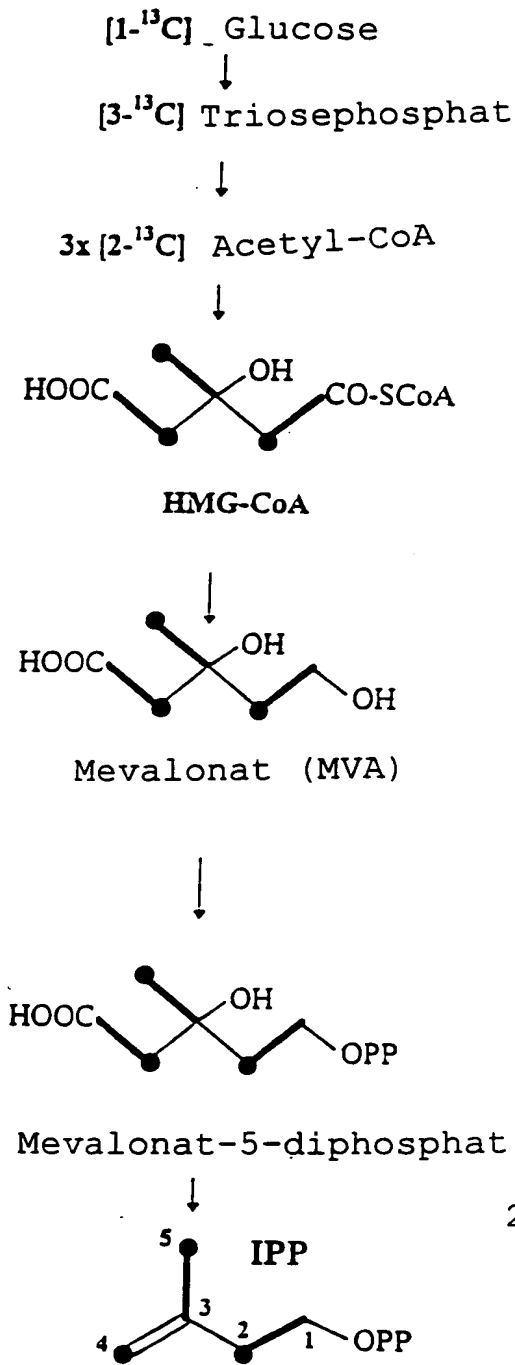


Fig. 6c

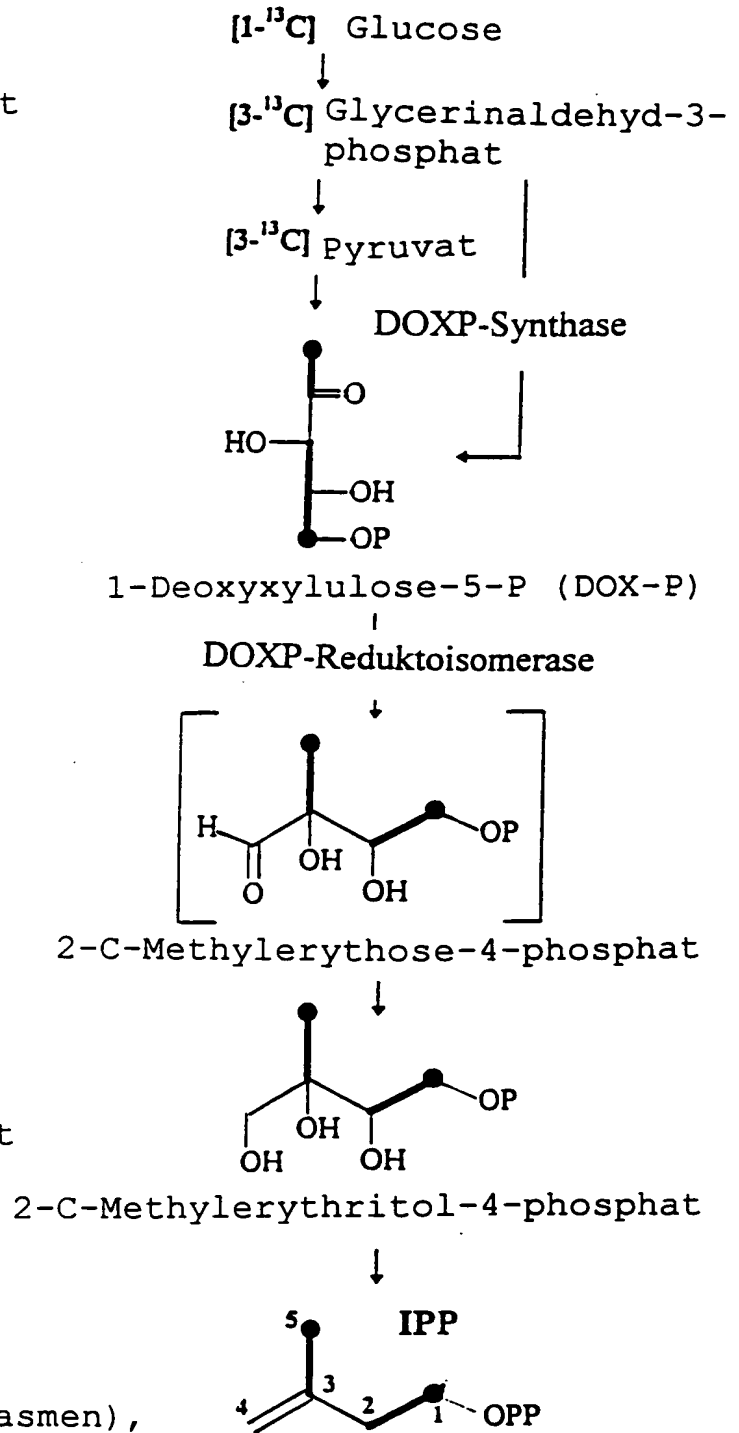
14.05.08.99

Klassischer Acetat/ Mevalonat-Pathway



höhere Pflanzen (Cytoplasmen),
Tiere, Pilze; Eubakterien

Alternativer DOX-P Pathway



höhere Pflanzen (Plastide),
Grünalgen, viele Eubakterien

Fig. 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)